



**Etude de l'activation de cellules pulmonaires par un
extrait de fumée de cigarette ou par l'élastase du
neutrophile associés au lipopolysaccharideEtude des
effets d'un inhibiteur de phosphodiesterase de type 4, le
roflumilast**

Tatiana Victoni

► **To cite this version:**

Tatiana Victoni. Etude de l'activation de cellules pulmonaires par un extrait de fumée de cigarette ou par l'élastase du neutrophile associés au lipopolysaccharideEtude des effets d'un inhibiteur de phosphodiesterase de type 4, le roflumilast. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1B004 . tel-00950306

HAL Id: tel-00950306

<https://theses.hal.science/tel-00950306>

Submitted on 21 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Sciences de la Santé
École doctorale VIE-AGRO-SANTÉ

présentée par

Tatiana Victoni

Préparée à l'unité de recherche UMR INSERM U991
Foie, Métabolismes et Cancer
Faculté des Sciences Pharmaceutiques & Biologiques

**Étude de l'activation de cellules pulmonaires par un
extrait de fumée de cigarette ou par l'élastase du
neutrophile associés au lipopolysaccharide
Étude des effets d'un inhibiteur de
phosphodiesterase de type 4, le roflumilast**

Thèse soutenue à Rennes le 24 juin 2013 devant le jury composé de :

Mr Michel Chignard
Mr Thierry Moreau
Mme Isabelle Couillin
Mr Luis C. Porto
Mme Lydie Sparfel-Berlivet
Mme Elisabeth Boichot
Mr Vincent Lagente

Directeur de Recherche INSERM U874, Paris
Professeur à l'Université François Rabelais, Tours
Chargé de Recherche CNRS UMR-INEM7355
Professeur à l'Université de l'État de Rio de Janeiro
Professeur à l'Université de Rennes 1
Professeur à l'Université de Rennes 1
Professeur à l'Université de Rennes 1

rapporteur
rapporteur
examineur
examineur
examineur
directeur de thèse
co-directeur de thèse

*Je dédie cette thèse à ma mère,
Pour tous les sacrifices qu'elle a faits
pour moi, pour mes soeurs et mon frère.*

Remerciements

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury. Je remercie le Docteur Michel Chignard et le Professeur Thierry Moreau d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je suis très honorée de vous avoir en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier vivement le Docteur Isabelle Coullin, le Professeur Cristovão Luis Porto et le Professeur Lydie Sparfel-Berlivet pour me faire l'honneur de votre présence au sein de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur Vincent Lagente et au Professeur Elizabeth Lorant Boichot, pour m'avoir encadrée ces 4 dernières années et pour avoir partagé leur expérience en recherche et en enseignement. Merci Vincent pour votre générosité et pour m'avoir donné l'opportunité d'acquérir des connaissances en participant à de nombreux congrès. Et surtout merci du temps que vous m'avez accordé ce jour de juillet 2008 lors d'un entretien pour une thèse. J'avais pris quelques jours de congé et vidé mon compte en banque pour un billet d'avion São Paulo-Paris afin de venir pour un entretien pour une possible thèse. Je ne le regrette pas et j'espère avoir été à la hauteur.

La réussite de ce manuscrit est également due aux différents doctorants et ingénieurs (Dounia, Nicolas, Anaïs, Sacha, Karine ron ron, Camille et Kathleen) qui ont travaillé sans compter pour corriger mon français maladroît. Je vous dois beaucoup et je n'ai pas de mot pour vous remercier.

Un grand merci à Bernard Fromenty et Marie-Anne Robin, pour votre accueil au sein de votre équipe. Officiellement, j'appartiens à l'équipe 4, mais beaucoup de liens d'amitié me lient à l'équipe 3.

Un grand merci à Florence pour son aide pour les manips, pour le français, mais aussi pour son expertise en mise en page et surtout pour m'avoir supportée ces derniers mois. De même, je tenais à remercier mes stagiaires, Marie, Benjamin, Lucie et Marion pour leur collaboration dans la réalisation de ce projet, j'espère vous avoir transmis quelque chose car j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je remercie le Professeur Samuel Valença et son équipe pour son accueil au sein de son laboratoire et son aide dans le cadre de notre collaboration.

Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées à l'unité INSERM U991, notamment Carine, Sophie, Thomas (2x), Karine Ron Ron, Pamela, Dounia, Kathleen, Sylvie, Ahmad, Adeodat, Ghislaine, Sacha, Florence (2x), Aurore, Houssein, Ghislaine et Françoise pour la bonne ambiance et pour les moments partagés.

Je remercie aussi les secrétaires de l'école doctorale VAS, Annick Robert et Badia Mssasi pour leur patience et leur disponibilité.

Durant ces années de thèse, j'ai eu la chance de créer des liens d'amitié au sein du laboratoire. Merci Camille, Laëtitia, Jacinthe, Anaïs et Julie. Nous avons passé de bons moments ensemble mais aussi des moments difficiles chacune à notre tour. Je suis contente de vous connaître et j'espère pouvoir conserver cette amitié encore de nombreuses années même au travers des kilomètres qui nous séparerons.

Je tiens à remercier particulièrement Siham. Mes débuts à Rennes n'ont pas toujours été faciles, mais grâce à toi Sisi, mon chemin a été plus léger avec ta patience à m'apprendre le français. Tu m'as donné l'exemple à suivre, avec ton courage inestimable. Un jour, tu seras une chercheuse renommée, ce jour là j'espère pouvoir dire encore que tu es ma meilleure amie.

Avec beaucoup d'émotion, je remercie ma famille, surtout toi maman pour avoir accepté mon absence, cru en moi et en mon rêve. A mon père qui a vu mes batailles, mais qui n'est pas là aujourd'hui pour voir mes conquêtes. À ma sœur aînée Milene pour tout ce que tu as fait pour moi, à ma petite sœur Luciana et mon frère Mirinho pour votre écoute et votre soutien. Je voudrais aussi remercier mes tantes, Vilma, Marlene et Cidinha qui ont contribué à ma réussite en m'encourageant à poursuivre mes études.

Enfin, merci Nico de ton soutien dans ces moments difficiles, de m'avoir écoutée et prêté ta famille pour être la mienne quand j'en avais besoin, merci de croire en moi à ma place.

TABLE DES MATIÈRES

I-INTRODUCTION	1
1. Anatomie des poumons	2
1.1. Structure des voies aériennes	2
1.2. Les cellules épithéliales pulmonaires	4
1.2.1. Les cellules de l'épithélium trachéobronchique	4
1.2.2. Les cellules de l'épithélium alvéolaire	5
2. Immunité innée	8
2.1. La reconnaissance des pathogènes et des agressions de l'environnement	8
2.1.1. Les «Toll-like Receptors» (TLRs)	8
2.1.2. Les « NOD-like Receptors » (NLRs)	10
2.1.3. Les «RIG-like Receptors» (RLRs)	10
2.1.4. Les « <i>C-type lectin receptors</i> » (CLRs)	10
3. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)	11
3.1. Définitions	11
3.2. Diagnostic	11
3.3. Épidémiologie	12
3.4. Facteurs de risque	13
3.4.1. Le tabagisme	14
3.4.2. La pollution de l'air intérieur et extérieur	15
3.4.3. L'exposition professionnelle à des polluants	16
3.4.4. Le facteur génétique	16
3.5. Exacerbations	17

3.6. Physiopathologie.....	18
3.7. Mécanismes cellulaires et moléculaires.....	19
3.7.1. Les cellules impliquées.....	21
3.7.1.1. Les cellules épithéliales.....	21
3.7.1.2. Les macrophages et monocytes.....	22
3.7.1.3. Les neutrophiles.....	23
3.7.1.4. Les lymphocytes.....	24
3.7.1.5. Les éosinophiles.....	25
3.7.2. Les médiateurs impliqués.....	25
3.7.2.1. Les cytokines.....	25
3.7.2.1.1. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).....	25
3.7.2.1.2. L'interleukine-1 β (IL-1 β).....	26
3.7.2.1.3. L'interleukine-6 (IL-6).....	26
3.7.2.2. Les chimiokines.....	26
3.7.2.2.1. L'interleukine 8 (IL-8/CXCL8).....	27
3.7.2.2.2. Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1/CCL2) ...	28
3.7.2.2.3. Growth Related Oncogene- α (GRO- α /CXCL1)	28
3.7.3. Les voies de signalisation impliquées.....	31
3.7.3.1. Les« Mitogen activated protein kinases » (MAP kinases)	31
3.7.3.2. Les «Janus Kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription » (JAK/STAT)	36
3.7.3.3. «Les Protein tyrosine kinases Scr family»	40
4. Mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la BPCO	42
4.1. Rôle de la balance protéase-antiprotéase	42
4.1.1. Les protéases	42
4.1.1.1. Les sérines protéases.....	43
4.1.1.1.1. L'élastase du neutrophile	43

4.1.1.1.2. La protéinase 3 et la cathepsine G	46
4.1.1.2. Les métalloprotéases (MMP).....	47
4.1.1.2.1. Les métalloprotéases 2.....	47
4.1.1.2.2. Les métalloprotéases 9	48
4.1.1.2.3. Les métalloprotéases 12.....	48
4.1.2. Les antiprotéases	49
4.1.2.1. Inhibiteurs de l'activité protéolytique des protéases à sérine du neutrophile.....	49
4.1.2.2. Les «Tissue Inhibitor of MetalloProteinases (TIMP) »	51
4.2. Déséquilibre de la balance oxydant/anti-oxydant.....	51
5. Les traitements contre la BPCO	54
5.1. Les traitements actuels.....	54
5.1.1. Le sevrage tabagique	55
5.1.2. Les bronchodilatateurs	55
5.1.3. Les Corticoïdes.....	56
5.1.4. Les inhibiteurs de phosphodiesterase	58
5.2. Vers de nouvelles propositions de traitements	61
5.2.1. Les antagonistes de cytokines et chimiokines.....	61
5.2.2. Les inhibiteurs de voies de transduction de signal	62
5.2.2.1. Les inhibiteurs du facteur nucléaire Kappa B.....	62
5.2.2.2. Les inhibiteurs de la mitogen-activated protein p38.....	62
5.2.2.3. Les inhibiteurs de PI3K	62
5.2.3. Les activateurs du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes 63	
5.2.4 Inhibiteurs de protéases	63
5.2.4.1 Inhibiteurs de l'élastase du neutrophile	63
5.2.4.2 Inhibiteurs de métalloprotéases.....	64
6. Modèles d'étude de la BPCO	65

6.1. Les modèles <i>in vitro</i>	65
6.1.1. Les modèles cellulaires d'exposition à la fumée de cigarette	66
6.1.2. Les modèles cellulaires d'exposition aux élastases.....	68
6.2. Les modèles <i>in vivo</i>	68
6.2.1. Les modèles <i>in vivo</i> d'exposition au LPS	68
6.2.2. Les modèles <i>in vivo</i> d'exposition aux protéases	69
6.2.3. Les modèles <i>in vivo</i> d'exposition à la fumée de cigarette	70
II-OBJECTIFS	71
III-RESULTATS	74
Chapitre 1 : Évaluation des effets de l'exposition de différents types cellulaires pulmonaires à la fumée de cigarettes seule ou associée au LPS	
1. Contexte scientifique.....	76
2. Résumé des principaux résultats	77
3. Conclusions	78
4. Résultats supplémentaires	79
Chapitre 2 : Évaluation des effets anti-inflammatoires du Roflumilast N-oxide sur des cellules épithéliales pulmonaires exposées à l'élastase du neutrophile	
1. Contexte Scientifique.....	120
2. Résumé des principaux résultats	120
3. Conclusions	119
IV-DISCUSSION	141

V-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	155
VI-RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	158
VII-ANNEXES	180

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Classification de la BPCO en 5 niveaux de sévérité croissante	12
Tableau 2 : Les récepteurs des cytokines et leurs protéines JAK et STAT	38
Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire de l'Homme	2
Figure 2 : Structure des lobules et des l'alvéole pulmonaires	53
Figure 3 : Structure cellulaire de l'épithélium bronchique.....	6
Figure 4 : Structure de l'alvéole pulmonaire	8
Figure 5 : Ligands des différents « <i>Toll-like Recepteurs</i> ».....	9
Figure 6 : Voies de signalisation des TLR	14
Figure 7 : Accélération du déclin du VEMS chez les sujets fumeurs	19
Figure 8 : Mécanismes cellulaires de la BPCO	29
Figure 9 : Représentation schématique du réseau des cytokines dans la BPCO	32
Figure 10 : Voies de signalisation des «Mitogen Activated Protein Kinases»	33
Figure 11 : Voies de signalisation des <i>Extracellular signa -regulated kinase</i>	33
Figure 12 : Représentation schématique de la voie de signalisation JNK	34
Figure 13 : Représentation schématique de la voie de signalisation p38	35
Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT	37
Figure 15 : Signalisation de la famille Src et voies de signalisation associées.....	41
Figure 16 : Implication du stress oxydatif dans la BPCO	53
Figure 17 : Stratégies thérapeutiques contre la BPCO.....	54
Figure 18 : Mécanisme de résistance aux corticoïdes chez un patient atteint de BPCO.....	57
Figure 19 : Cibles potentielles des inhibiteurs de la phosphodiesterase 4	59
Figure 20 : Trois méthodes de production de la fumée pour des tests <i>in vitro</i>	63

Figure 21: Effet du l'extrait de fumée de cigarette CSE associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8.	80
Figure 22: Effet de l'antagoniste du récepteur de TLR4 sur la libération de chimiokines induite par du LPS 0,5 µg/ml et par du CSE associé au LPS. Expression du TLR4 par les cellules A549 stimulées avec du CSE associé au LPS	81
Figure 23: Effet de deux corticoïdes, budesonide (A) et dexaméthasone (B) sur la libération d'IL-8/CXCL8 induite par l'extrait de fumée de cigarette associé au LPS	82
Figure 24: Effet du LPS sur la libération de chimiokines par des cellules épithéliales bronchiques d'un patient atteint de BPCO. Effet du CSE associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8, Gro-α/CXCL1 et MCP-1/CCL2 par les DHBE.....	84
Figure 25: Effet du CSE associé au LPS sur la libération d'IL-1β, TIMP-1, MMP-9, d'IL-8/CXCL8 et IL-6 par des macrophages.....	86
Figure 26: Effet du CSE seul ou associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 par une co-culture de macrophages et de cellules épithéliales alvéolaires (A549)	87
Figure 27 : Schéma sur les différents récepteurs et voies de signalisation qui peuvent être activé par la fumée de cigarette, par le LPS et par la NE.....	157

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPc	Adenosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activating Protein-1
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CG	Cathepsine G
CSE	Cigarette Smoke Extract
CV	Capacité Vitale
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAMPs	Danger-Associated Molecular Pattern
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GOLD	Global initiative for Obstructive Lung Disease
GR	Glucocorticoid Receptor
GRO-α	Growth Related Oncogene- α
HAT	Histone Acétyle Transférase
HDAC	Histones-Deacetylase
IL-1/13	Interleukine-1/13
INF	Interféron
IPDE	Inhibiteur de Phosdiestérases
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
LABAs	Long Acting β 2-receptor Agonists
LAMAs	Long Acting Muscarinic receptor Antagonists
LBA	Liquides de Lavages BronchoAlvéolaires
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	MAPK/ERK Kinase
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix MetalloProteinase
MUC5AC	Mucine 5AC
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NE	Neutrophil Elastase
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLR	NOD-like Receptors
NOD	Nucleotid-binding Oligomerization Domain
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAR	Protease Activated Receptor
PDE	Phosphodiesterase

PGE₂	Prostaglandine 2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Pr3	Protéase 3
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
TGF-α/β	Transforming Growth Factor- α/β
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TRIF	TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β
VEMS	Volume Expiré Maximal par Seconde
α1-PI	Alpha-1 Protéinase Inhibiteu

Introduction

I-INTRODUCTION

1. Anatomie des poumons

1.1. Structure des voies aériennes

Le système respiratoire peut être divisé en deux parties. Les voies aériennes supérieures, comprenant la bouche, la cavité nasale, le pharynx et le larynx puis les voies aériennes inférieures, composées de la trachée, des deux bronches souches, leurs branches et les poumons. Les poumons représentent les organes essentiels de l'appareil respiratoire. Ils sont au nombre de deux, le poumon droit et le poumon gauche. Ils sont séparés par le médiastin et entourés par la plèvre. Le poumon droit est divisé en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur), et le gauche en deux lobes (supérieur et inférieur). Ils sont localisés dans la cage thoracique et sont nécessaires à la respiration, c'est à-dire à l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone entre l'air et le sang.

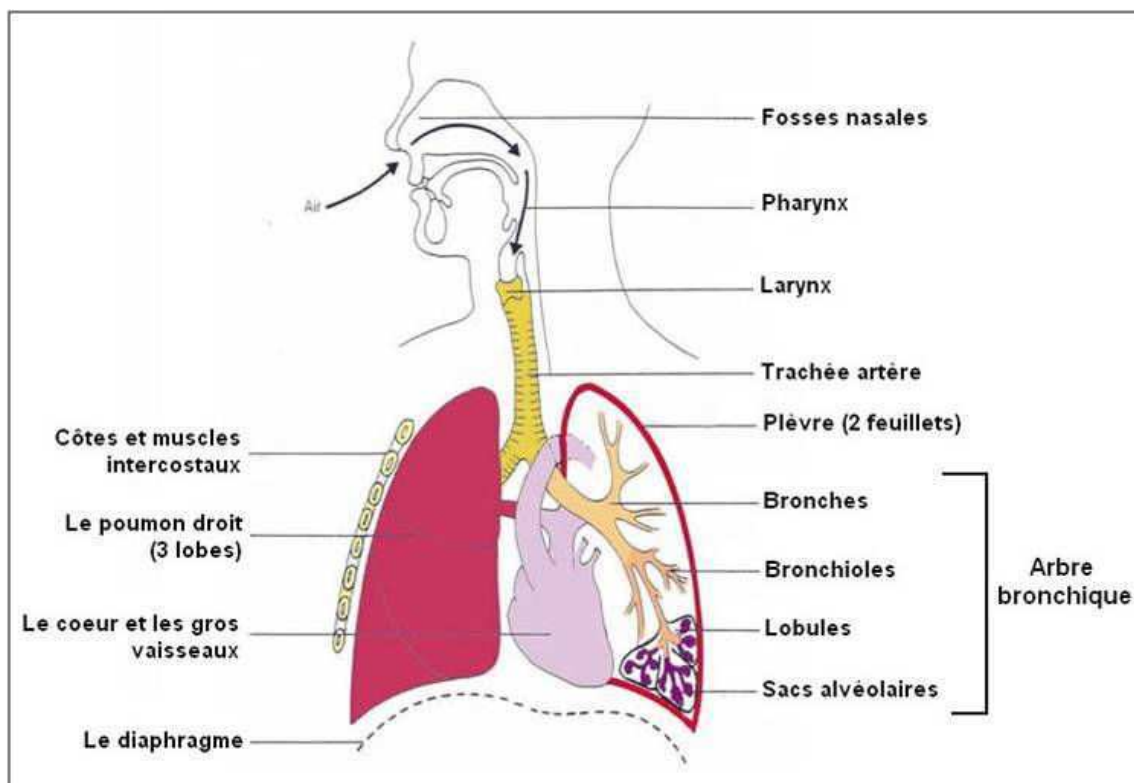


Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire de l'Homme

(D'après www.paramed-prepa.com/tableauaccueil.php3?num=17.)

L'air entre dans le tractus respiratoire supérieur par la bouche et le nez, puis il passe dans le pharynx localisé dans la gorge. Du pharynx, le flux d'air est dirigé vers la trachée en

traversant le larynx. La trachée est un tube semi-flexible maintenu ouvert par 15 à 20 anneaux cartilagineux en forme de « C ». Elle descend dans le thorax où elle se divise en deux bronches, une pour chaque poumon. Dans les poumons, les bronches se ramifient et, après environ 25 générations de ramifications, les bronchioles terminales aboutissent dans de petites cavités pulmonaires, appelées alvéoles. L'ensemble des structures véhiculant l'air inspiré et expiré, entre le larynx et les alvéoles pulmonaires, est appelé l'arbre bronchique (Figure 1). On estime à 500 millions le nombre d'alvéoles, représentant une surface d'environ 75 m² destinée aux échanges gazeux entre l'air et le sang (Figure 2).

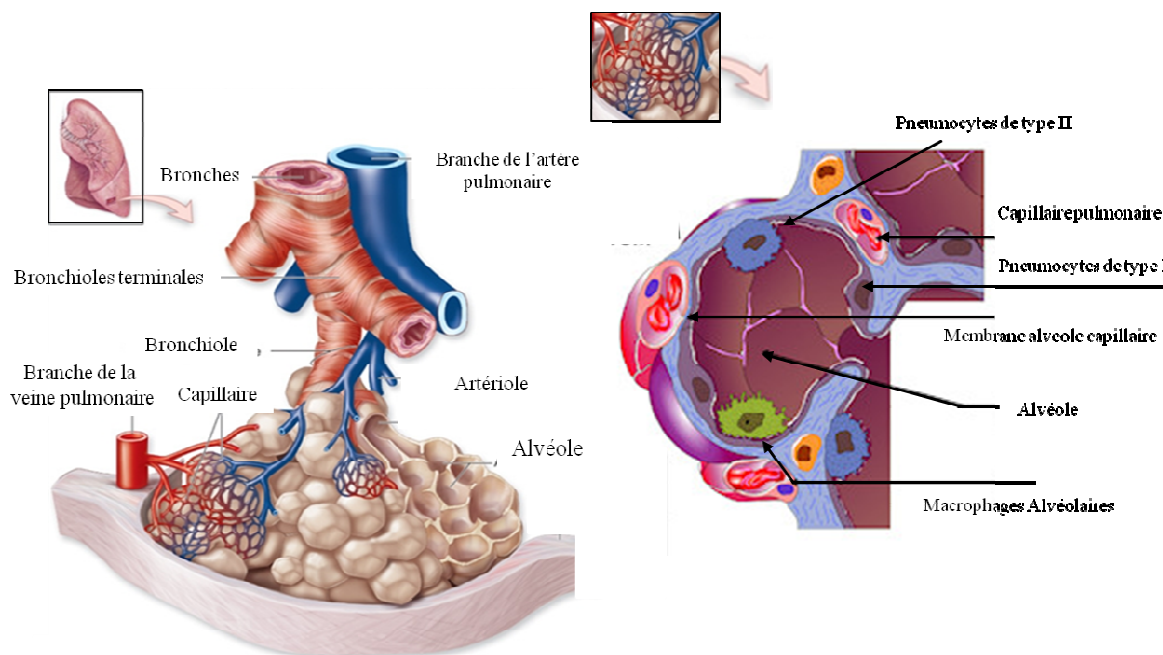


Figure 2: Structure des lobules et des l'alvéole pulmonaires

(D'après http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f259a_bronchioles_and_c.jpg)

La trachée et les bronches, jusqu'à la 10^{ème} division, comportent une tunique fibro-élastique avec des cartilages qui les séparent du parenchyme adjacent (bronches cartilagineuses) alors que les générations suivantes en sont dépourvues. La totalité de ces voies de conduction est recouverte d'une muqueuse, avec des glandes bronchiques, un réseau élastique et un réseau musculaire lisse. Cette ceinture de cellules musculaires régule le diamètre des voies aériennes (bronchoconstriction ou bronchodilatation).

Au niveau d'une alvéole, se situe la membrane alvéole-capillaire qui comporte trois éléments : les capillaires sanguins, l'interstitium, et l'épithélium de revêtement. Les capillaires sanguins sont de type continu avec un diamètre de 5 à 7 µm et composés des

cellules endothéliales riches en myofilaments. Cet endothélium, intimement accolé à l'épithélium alvéolaire, assure une surface d'échange considérable entre le sang et le milieu extérieur. L'interstitium représente quant à lui l'espace entre deux alvéoles, où se trouvent les capillaires. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche et élastique qui contient du collagène, de l'élastine (fibres élastiques), des monocytes et macrophages, des lymphocytes et des cellules interstitielles contractiles (myofibroblastes).

1.2. Les cellules épithéliales pulmonaires

L'organisation morphologique et la composition cellulaire de l'épithélium varient selon les diamètres des voies aériennes. L'épithélium trachéobronchique est composé de cellules ciliées, de cellules sécrétoires et cellules basales. L'épithélium alvéolaire est constitué de pneumocytes de type I et II.

1.2.1. Les cellules de l'épithélium trachéobronchique

L'épithélium trachéobronchique est un épithélium de revêtement pseudostratifié. Toutes les cellules de l'épithélium sont en contact avec la lame basale, mais seules certaines d'entre elles s'allongent jusqu'à la lumière bronchique. La lame basale se repose sur un chorion de tissu conjonctif, la *lamina propria*. Cet épithélium est composé de cellules ciliées, caliciformes, de cellules sécrétoires et de cellules basales (Figure 3).

Les cellules ciliées sont les plus abondantes de l'épithélium respiratoire, car elles constituent 50% de celui-ci. Elles possèdent des cils situés au pôle apical de la cellule. Les cellules basales sont des petites cellules arrondies reposant sur la lame basale et n'atteignant pas la lumière de la voie respiratoire. Ce sont des cellules source qui donnent naissance à tous les autres types cellulaires.

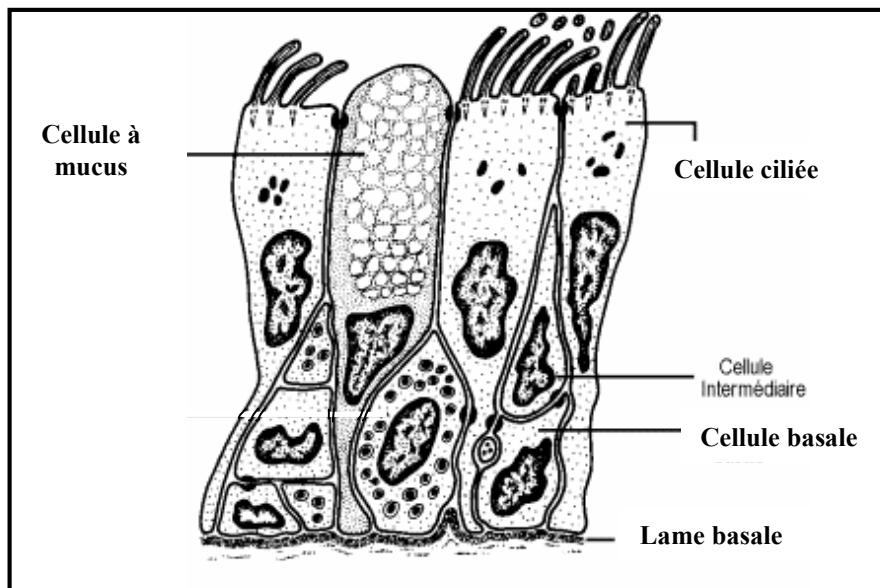


Figure 3 : Structure cellulaire de l'épithélium bronchique

Il existe plusieurs types de cellules sécrétoires, parmi elles les cellules caliciformes et les cellules de Clara. Les cellules caliciformes représentent 25 % des cellules de l'épithélium bronchique. Leur fonction principale est la sécrétion de mucus en réponse aux agressions environnementales. Le mucus agit comme une barrière physique. Il retient les particules inhalées et les pathogènes et les transporte hors des poumons à l'aide des battements ciliaires et de la toux. Les mucines sont les principaux composants du mucus, la MUC5AC et MUC5B sont les mucines prédominantes dans les voies respiratoires. La production de mucus, associée aux battements ciliaires, favorise la clairance mucociliaire. La clairance mucociliaire est considérée comme le premier mécanisme de défense innée des voies respiratoires. Ce mécanisme de défense peut être altéré par des infections bactériennes ou virales ainsi que par la fumée de cigarette.

Les cellules de Clara sont également des cellules sécrétrices, elles ont aussi d'autres fonctions protectrices dans le poumon. Ces cellules sont capables de détoxifier le poumon de certains xénobiotiques et certains gaz oxydants. La sécrétion de molécules comme les composants du surfactant pulmonaire et des molécules de défense contre les pathogènes impliquées dans la réponse immunitaire, telles des antiprotéases et des cytokines, sont également une caractéristique de ces cellules (Sallenave et al., 1993)

1.2.2. Les cellules épithéliales alvéolaires

L'épithélium de la paroi des alvéoles pulmonaires, qui est en continuité avec l'épithélium bronchique, est formé principalement de pneumocytes de type I et II (Figure 4).

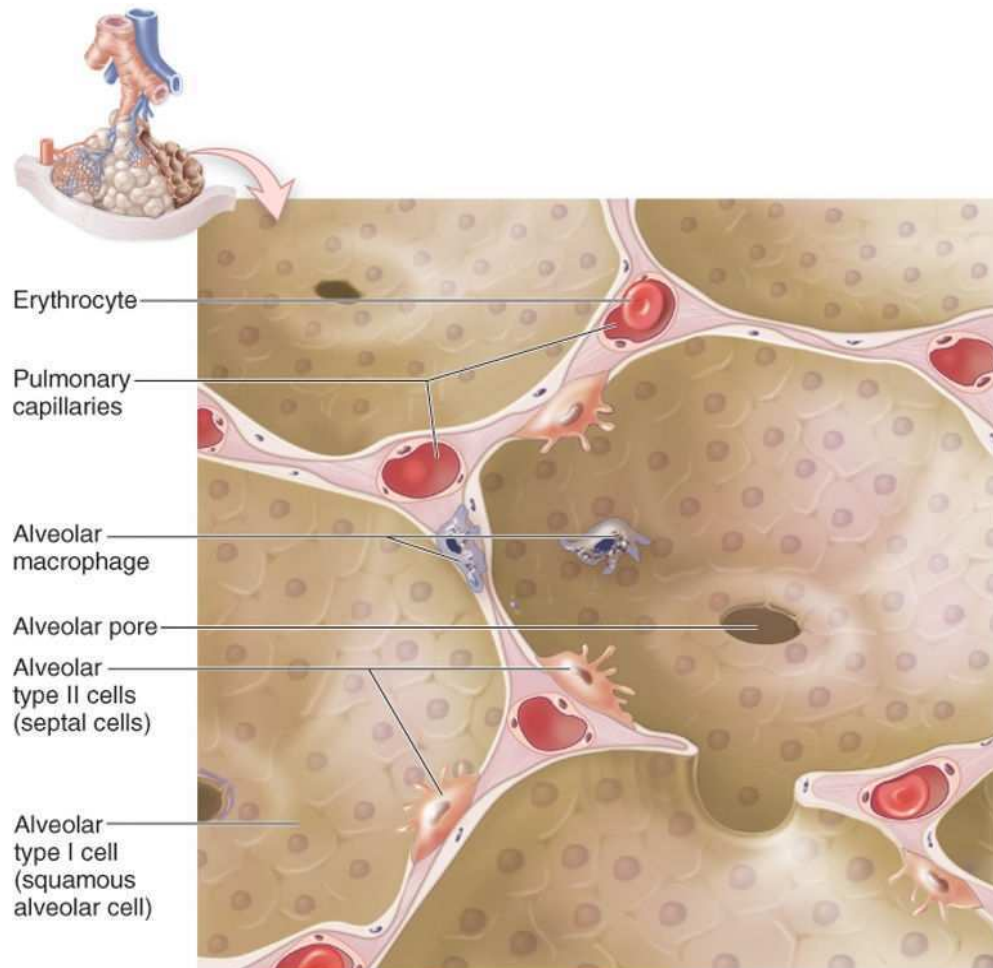


Figure 4 : Structure de l'alvéole pulmonaire

(D'après <http://imagin.health.over-blog.com/pages/Bronchiolite-116828.html>)

Les cellules alvéolaires de type I (encore appelées pneumocytes de type I) sont des cellules extrêmement aplaties qui bordent les surfaces alvéolaires. Elles recouvrent 97% de la surface alvéolaire (les cellules alvéolaires de type II recouvrant les 3% restants), elle comprend 8% du total des cellules du poumon normal adulte. Mais elles représentent environ 40% des cellules de la surface alvéolaire. La principale fonction de ces cellules est de constituer une barrière d'épaisseur minimale très perméable aux gaz. Différentes études suggèrent que les cellules alvéolaires de type I sont dérivées des cellules alvéolaires de type II lors de la réparation de l'épithélium lésé (Pattle, 1955).

De leur côté, les pneumocytes de type II, ont pour la plupart une forme cubique. Ils représentent 60% des cellules de l'épithélium, soit 15% de la totalité des cellules pulmonaires. Ils sont à l'origine de la régénération de l'épithélium et de la synthèse du liquide alvéolaire. Ce liquide contient principalement le surfactant, qui est constitué de phospholipides et de protéines. Le surfactant tapisse la surface des alvéoles pulmonaires et évite le collapsus de celles-ci lors de l'expiration (Herzog et al., 2008). Les cellules alvéolaires peuvent interagir avec d'autres cellules voisines. En effet, les pneumocytes de type II secrètent de l'*insulin-like growth factor* (IGF) de type 1 qui peut affecter la formation de la matrice extracellulaire par les fibroblastes. De plus, ces cellules peuvent libérer des molécules chimioattractantes comme l'interleukine-8 (IL-8/CXCL8) et MCP-1/CCL2 (chemokine ligand 2). Ces molécules peuvent induire le recrutement des macrophages alvéolaires et des neutrophiles (Griffin et al., 1993; O'Brien et al., 1998).

L'épithélium alvéolaire comprend également des macrophages alvéolaires résidents mais mobiles sur la paroi des alvéoles. Des dizaines de millions de monocytes migrent chaque jour de la micro vascularisation vers le tissu pulmonaire, où ils se différencient en macrophages alvéolaires. Ils participent à la fois à la défense non spécifique, par leur capacité de phagocytose et à la défense spécifique, par leur aptitude à stimuler une réponse immune. Les autres cellules de l'immunité innée (leucocytes : monocytes, neutrophiles, éosinophiles) et acquise (lymphocytes) affluent dans le tissu pulmonaire lors d'une agression et de la réaction inflammatoire qui en découle, mais sont très peu abondantes en conditions physiologiques.

2. Immunité innée

2.1. La reconnaissance des pathogènes et des agressions de l'environnement

Au cours d'une agression, la première ligne de défense des voies respiratoires est assurée par la fonction de barrière de l'épithélium. La seconde ligne de défense est assurée par les réponses immunitaires innées et adaptatives. Une grande partie de la réponse immunitaire innée est déclenchée par certaines protéines ou récepteurs cellulaires de l'hôte, appelés les « *Pattern-Recognition Receptor* » (PRR). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des fragments moléculaires de pathogènes, appelés les PAMPs « *Pathogen-Associated Molecular Pattern* » mais également des molécules produites de manière endogène lors de périodes de stress physiologique, appelées les DAMPs « *Danger-Associated Molecular Pattern* ». Les PRR sont essentiels à la réaction immunitaire dans les poumons. Les PRR comprennent les « *Toll-like Recepteurs* » (TLR) associées à la membrane ainsi que les protéines cytosoliques NOD « *Nucleotid-binding Oligomerization Domain* » (NOD) et les « *RIG-like Receptors* » (RLR).

2.1.1. Les « *Toll-like Recepteurs* » (TLR).

Le récepteur Toll a initialement été identifié chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) comme un gène important pour l'embryogenèse. En 1996, Jules Hoffmann et son équipe montrent que Toll participe également à l'immunité antifongique chez la drosophile (Lemaitre et al., 1996). À ce jour, douze récepteurs de la famille des TLR ont été identifiés. Dix ont été décrits chez l'Homme (TLR1 à TLR10) et douze chez la souris (TLR1 à TLR9, TLR12 et TLR13) (Medzhitov, 2001; Takeda and Akira, 2004). Les ligands de ces différents TLR sont représentés dans la figure 5.

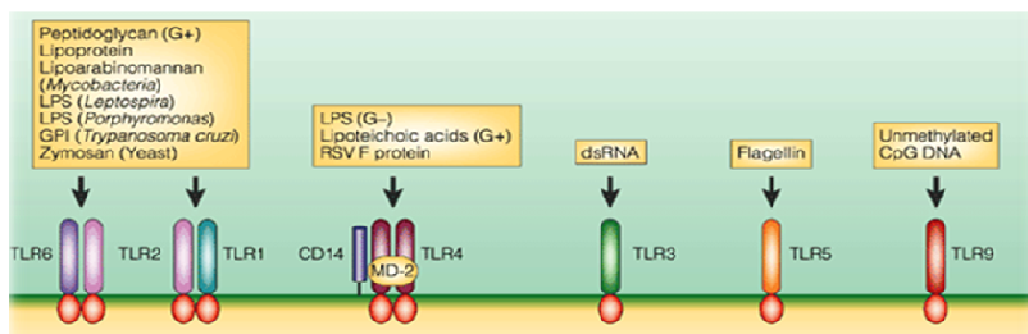


Figure 5 Ligands des différents *Toll-like Recepteurs* » (TLR)

(D'après Ruslan Medzhitov et al., 2001)

Lorsque ce récepteur est activé par son agoniste, il recrute différentes protéines adaptatrices, notamment le MyD88 (*Myeloid Differentiationkinterferon-β*) et TRAF6. Tous les TLR à l'exception du TLR3 mobilisent l'adaptateur MyD88. Ces cascades d'événements activent certaines protéines kinases (ERK, JNK et p38) et des facteurs de transcription tels que NF-κB (Biondo et al., 2012).

La cascade de signalisation de TLR conduit à la transcription des gènes cibles et par la suite, à la production de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL1-β, l'IL-6 et l'IL-8/CXC8 (Kvarnhammar and Cardell, 2012).

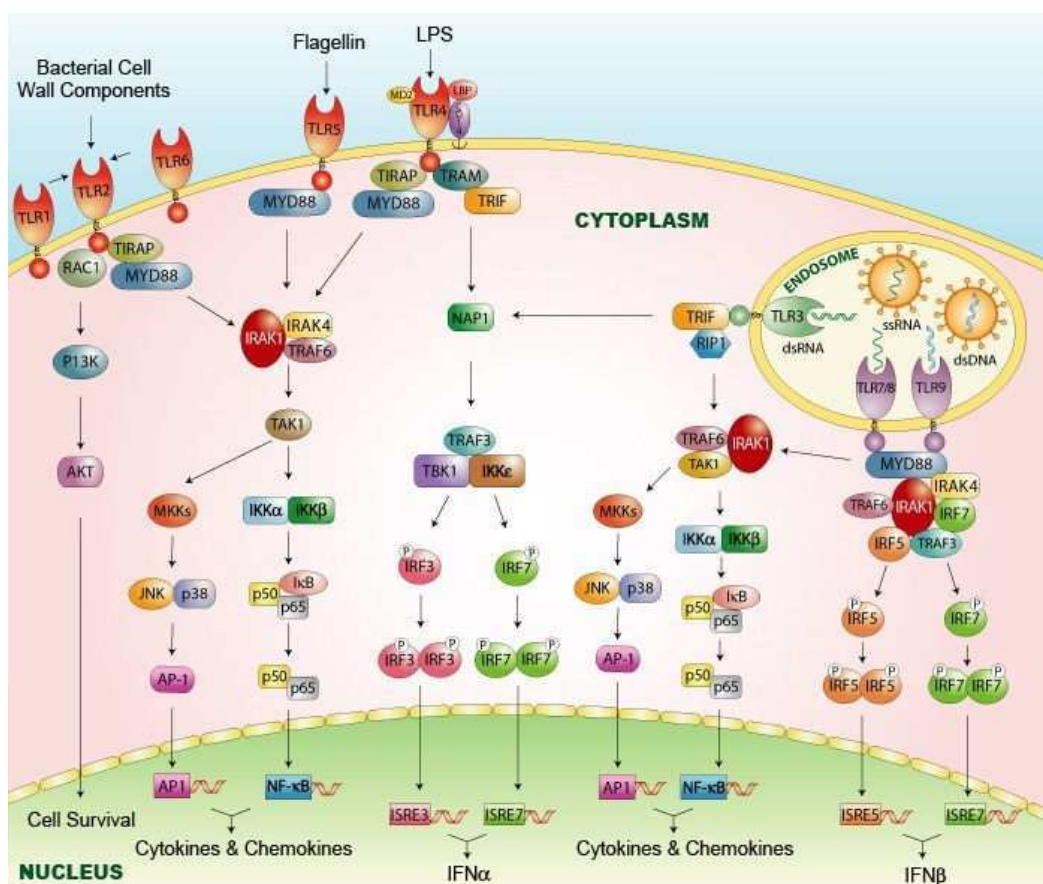


Figure 6: Voies de signalisation des TLR

(http://discover8.com/public/images/upload_article_images/Toll_Like_Receptors_Pathway.jpg)

En plus de leur rôle protecteur contre les infections microbiennes, les TLR détectent différentes molécules de la matrice extracellulaire, comme par exemple l'hyaluronan (Kvarnhammar and Cardell, 2012).

Les TLR sont exprimés dans différents tissus et types cellulaires. Les TLR sont localisés sur la membrane cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) ou dans des compartiments intracellulaires tels que l'endosome (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9).

L'expression des TLR a été confirmée par plusieurs auteurs sur les cellules inflammatoires, les cellules musculaires lisses et épithéliales des voies aériennes (Kvarnhammar and Cardell, 2012; Pace et al., 2008).

2.1.2. Les « *NOD-like Receptors* » (NLRs)

Les récepteurs NOD (« *Nucleotid-binding Oligomerization Domain* ») sont des protéines cytoplasmiques capables de détecter les PAMPs. Les NOD englobent plus de 20 membres, mais NOD1, NOD2, NLRC4 (NLR-CARD CONTAINING DOMAIN 4) et NALP3 sont les plus décrits. NOD1 et NOD2 reconnaissent les peptidoglycanes bactériens lorsque NOD4 se lie à la flagelline. L'activation de ces récepteurs mène à l'activation de la voie NF- κ B et à la production de cytokines pro-inflammatoires. La production d'IL-8/CXCL8 est liée à NOD1 et NOD2 et la stimulation de NLRC4 et de NALP3 se traduit par la maturation de l'IL-1 β (Skeldon and Saleh, 2011)

2.1.3. Les « *RIG-like Receptors* »

Les RLR ou ARN-hélicase sont des récepteurs intracellulaires capables de reconnaître l'ARN viral. Ils activent la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme les IFN de type I. Les RLR sont le RIG (*retinoic acid-inducible*) et MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) (Nakhaei et al., 2009)

2.1.4. Les « *C-type lectin receptors* »

Des études récentes ont identifié les CLR comme une importante famille de PRR. Ces récepteurs sont impliqués dans l'induction d'expression des gènes spécifiques aux agents pathogènes, soit par induction directe de l'expression de ce gène, soit par modulation de la signalisation du TLR (Gringhuis et al., 2007). Les CLR sont exprimées par les cellules dendritiques et interagissent avec des agents pathogènes principalement par la reconnaissance des glucides et des structures glucidiques. Les CLR reconnaissent la plupart des pathogènes tel que les virus, les champignons, les mycobactéries, certaines bactéries et les helminthes. La reconnaissance par les CLR conduit à l'internalisation de ces agents pathogènes et à leur dégradation (Zelensky and Gready, 2005).

3. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

3.1. Définition

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie de progression lente, caractérisée par une limitation des débits aériens dont la réversibilité est incomplète, et associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons suite à l'exposition à des substances nocives gazeuses ou particulaires (*“Global Strategy for the diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease” 2006*)

La BPCO permet de réunir sous un même terme la bronchite chronique, la bronchite chronique obstructive et l'emphysème. La bronchite chronique est définie selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une toux et des expectorations chroniques survenant au minimum 3 mois par an depuis au moins 2 années consécutives. L'emphysème a, quant à lui, une définition anatomique. Il s'agit d'un élargissement anormal des espaces aériens, situés au-delà des bronchioles terminales, accompagné d'une destruction des parois élastiques des alvéoles.

La limitation des débits aériens, caractéristique de la BPCO, est la conséquence de pathologies inflammatoires des petites voies aériennes (bronchites obstructives) et de la destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème). L'inflammation chronique est plus particulièrement caractérisée par une infiltration de cellules inflammatoires telles que les polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T CD8⁺. Cette inflammation entraîne d'une part, des changements structuraux et un rétrécissement des petites voies aériennes, et d'autre part, une destruction du parenchyme liée à une rupture des *septa* (parois) alvéolaires et à une diminution de l'élasticité pulmonaire. L'ensemble de ces lésions entraîne des anomalies fonctionnelles respiratoires mises en évidence par l'exploration fonctionnelle respiratoire (Barnes et al., 2003).

3.2. Diagnostic

La toux et l'expectoration chroniques sont les premiers signes fonctionnels de la BPCO. La dyspnée (essoufflement) est le symptôme d'un stade plus avancé de la maladie. Le diagnostic clinique d'une BPCO est confirmé par des tests de spirométrie. Ces tests permettent également de détecter et décrire la sévérité d'une BPCO. Au cours de ces tests, la

Capacité Vitale (CV) (le volume mobilisable entre l'expiration maximale et l'inspiration maximale) et le Volume Expiré Maximal par Seconde (VEMS) sont mesurés. En conditions non pathologiques, le VEMS/CV ou l'indice de Tiffeneau qui est le rapport VEMS/CV, exprimé en pourcentage doit être supérieur à 75-80%. Un VEMS inférieur à 80% de la valeur théorique et un rapport VEMS/CV inférieur à 70%, après administration d'un broncho-dilatateur, signent la présence d'une limitation du débit aérien qui n'est pas complètement réversible.

La BPCO est décomposée en 5 niveaux de sévérité croissante (de 0 à IV) en fonction des valeurs de VEMS et de l'indice de tiffeneau (tableau 1).

Niveau de gravité	Caractéristiques
0: Potentiellement à risque	Spirométrie normale Symptômes: toux, expectorations
I: BPCO « Bénigne »	VEMS/CV < 70% VEMS ≥ 80% de la valeur théorique Avec ou sans symptôme
II: BPCO « Modérée »	VEMS/CV < 70% 50% ≤ VEMS < 80% de la valeur théorique Avec ou sans symptôme
III: BPCO « Sévère »	VEMS/CV < 70% 30% ≤ VEMS < 50% de la valeur théorique Avec ou sans symptôme
IV: BPCO « Très sévère »	VEMS/CV < 70% VEMS < 30% de la valeur théorique ou VEMS < 50% de la valeur théorique en présence d'insuffisance respiratoire chronique ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg} = 8 \text{ kPa}$)

Tableau 1: Classification de la BPCO en 5 niveaux de sévérité croissante.

Abréviations : VEMS ; Volume Expiré Maximal par Seconde. CV ; Capacité Vitale (GOLD, 2006).

3.3. Épidémiologie

La BPCO est une maladie chronique fréquente, avec un poids important en termes de morbidité et de coûts. L'OMS estime que, dans les pays industrialisés, cette maladie figure au cinquième rang des causes de mortalité les plus fréquentes. Elle prévoit qu'en 2020, cette

affection sera la troisième cause de mortalité et la cinquième cause de morbidité (Mathers and Loncar, 2006). Sa prévalence est difficile à évaluer car la BPCO est une maladie qui reste longtemps silencieuse et est sous-diagnostiquée, mais elle est estimée à 7,5 % en France (Fuhrman et al., 2006). Le sous-diagnostic peut s'expliquer par la banalisation des premiers symptômes évocateurs chez des patients fumeurs mais aussi par la nécessité de mesurer les fonctions pulmonaires pour établir le diagnostic. Dans le monde, la BPCO touche plus de 44 millions de personnes, soit 4 à 10% de la population adulte (Source : Ministère de la Santé, juillet 2005). Des études plus récentes montrent que la prévalence de la BPCO varie considérablement selon les pays et les populations, la méthode de diagnostic et l'âge, avec une prévalence de 0,2% au Japon et de 37% aux États-Unis. En 1993, 20% des patients atteints de BPCO étaient des femmes. Aujourd'hui, l'incidence de la BPCO semble se stabiliser chez l'homme et augmenter chez la femme ; elles représentent maintenant 40 à 45% des cas de la BPCO. Cette augmentation est vraisemblablement liée au fait qu'elles sont plus nombreuses à fumer des cigarettes et donc plus exposées aux risques (Rycroft et al., 2012). Le taux de mortalité donne une image fidèle de la gravité de cette maladie. Elle varie selon les pays, allant de 3 à 9 décès pour 100.000 habitants au Japon. Et de 7 à 111 décès pour 100.000 habitants aux États-Unis. La mortalité induite par la BPCO était plus grande dans la population masculine que féminine au sein de la population et était majorée chez les adultes de plus de 75 ans (Rycroft et al., 2012). En 2006, 16495 certificats de décès comportant une mention de BPCO ont été enregistrés en France, parmi ceux-ci, 7391 la mentionnaient comme cause initiale du décès. Chez les adultes de 45 ans ou plus, le taux de mortalité par BPCO était de 41/100 000 chez les hommes et 17/100 000 chez les femmes (Fuhrman et al., 2006).

3.4. Facteurs de risque

L'identification du facteur de risque est un pas important vers le développement d'une stratégie de prévention et de traitement pour la BPCO. Bien que le tabac soit le principal facteur de risque, il n'est pas la seule cause de cette maladie. En effet, différents travaux d'épidémiologie montrent que des non fumeurs peuvent développer une BPCO (Chen and Mannino, 1999). L'exposition professionnelle aux polluants, la pollution de l'air intérieur et extérieur et des facteurs génétiques sont décrits comme des facteurs de risque dans cette pathologie.

3.4.1. Le Tabagisme

Le principal facteur causal et aggravant de la BPCO est indiscutablement le tabac. La fumée de cigarette contient plus de 4500 composants dans sa phase gazeuse, parmi eux, des particules, des radicaux libres et des produits chimiques réactifs. Ceux-ci sont les responsables d'un processus inflammatoire dans les voies respiratoires. De multiples études ont montré que la fréquence, l'évolution fonctionnelle et la mortalité de la BPCO, sont étroitement liées à l'importance de la consommation tabagique (Hogg and Timens, 2009) (Figure 7). Ainsi, 80 à 90% des cas de la BPCO sont liés au tabac, le risque augmentant avec l'ancienneté et l'intensité de l'addiction. En revanche, seulement 10 à 15% des fumeurs développent une BPCO. Il existe ainsi, à consommation égale, une susceptibilité individuelle au tabac due à des facteurs environnementaux et génétiques encore mal connus.

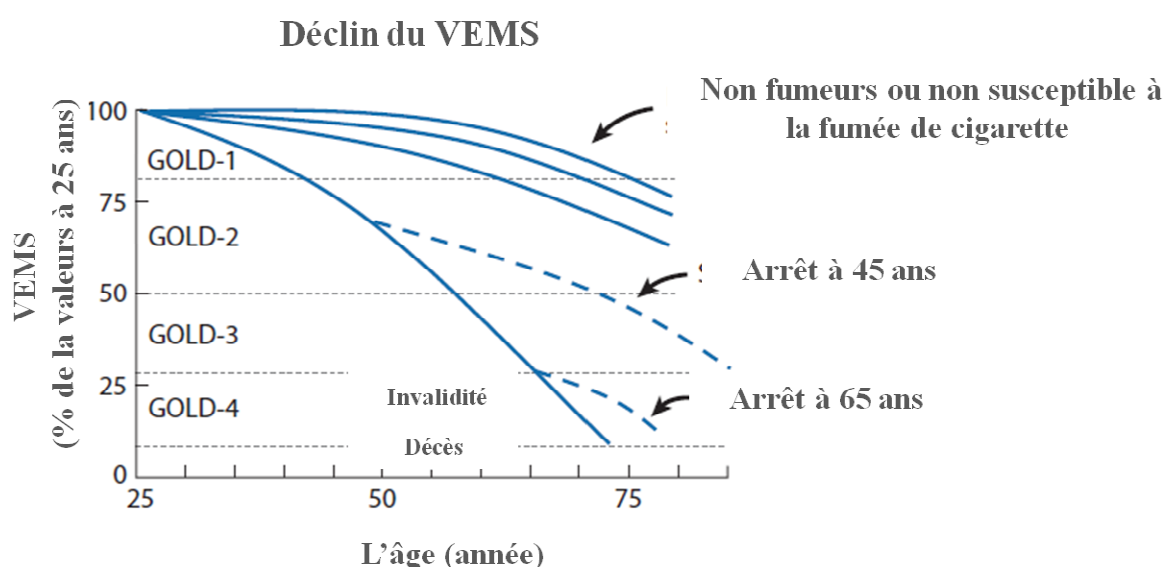


Figure 7: Accélération du déclin du VEMS chez les sujets fumeurs sensibles à la fumée du tabac.

(D'après Hogg et al., 2009)

Les taux de mortalité et de morbidité sont élevés chez les fumeurs de pipes et de cigares, mais restent inférieurs à ceux rencontrés chez les fumeurs de cigarettes. À noter que le cannabis a récemment été reconnu comme responsable de lésions bronchiques pouvant générer une BPCO. Consommé surtout par les jeunes, souvent en association avec le tabac, il peut être considéré comme un facteur de risque dont l'importance va s'accroître dans les prochaines années (Tashkin et al., 1987).

Bien que la fumée de cigarette soit la principale cause de la BPCO, l'arrêt du tabagisme ne permet pas une résolution de la réponse inflammatoire des voies aériennes. Ce fait suggère que la réponse inflammatoire devient stable. Mais, l'arrêt total et définitif du tabac constitue un axe principal du traitement.

3.4.2. *Pollution de l'air intérieur et extérieur*

Parmi la population mondiale atteinte de la BPCO, certains malades n'ont jamais fumé, ce qui indique que le tabagisme ne suffit pas à expliquer la prévalence de cette maladie. La pollution est un élément aggravant de la BPCO, que ce soit la pollution atmosphérique (gaz d'échappement ou émissions industrielles de fumées produites par la combustion de biomasse des sources animales ou végétales) ou domestique (combustion de matières solides pour la cuisson des aliments ou le chauffage). Cette pollution contribue énormément à la fréquence de la BPCO dans des pays en développement comme l'Inde, la Chine et la Guatemala (Diaz et al., 2007; Kendrick et al., 2000; Liu et al., 2007). La combustion de biomasse est particulièrement dangereuse car les fumées contiennent des taux importants de polluants (monoxyde de carbone, oxyde d'azote, formaldéhyde et benzène) qui sont une source majeure d'irritants respiratoires (Balakrishnan et al., 2002). De plus, la moitié de la population mondiale y est exposée. Dès le début des années 80, il a été montré que l'exposition à la fumée de bois équivalait à un tabagisme actif de 20 paquets de cigarettes par an et des similitudes ont été retrouvées au niveau des lésions pulmonaires induites par la fumée de bois et de tabac sur des modèles expérimentaux. (*Recherche Santé Environnement Intérieur*, Bulletin Décembre 2006). On estime à 2 millions le nombre de femmes et d'enfants morts chaque année suite à une exposition à ce type de pollution de l'air intérieur (GOLD, 2006).

D'après un certain nombre d'études, une forte prévalence de dyspnée et de symptômes de bronchite chronique serait observée dans les zones exposées à la pollution atmosphérique, due aux gaz d'échappement des voitures et aux émissions de fumées industrielles. Les admissions à l'hôpital pour exacerbations de BPCO sont augmentées les jours où le taux de pollution est élevé. Il semble toutefois impossible d'assigner à un polluant donné une responsabilité spécifique en matière de BPCO (Anderson et al., 1997)

3.4.3. *L'exposition professionnelle à des polluants*

Il est difficile d'étudier les BPCO d'origine professionnelle pour plusieurs raisons. Tout d'abord elles sont souvent précédées d'asthme ou accompagnées de manifestations évoquant l'asthme. De plus il est difficile de les distinguer des BPCO liées au tabagisme car la grande majorité des sujets atteints de BPCO en milieu industriel sont des fumeurs ou d'anciens fumeurs.

Le milieu du textile est un secteur d'activité professionnelle particulièrement touché en raison d'une exposition à de très fortes concentrations de poussières textiles végétales. Les premières BPCO d'origine professionnelle ont ainsi été identifiées dans les années 60 chez les ouvriers de l'industrie du coton. On note un fort taux de bronchite chronique, de trouble ventilatoire obstructif et d'hyperréactivité bronchique chez les travailleurs de l'industrie textile.

Il existe aussi un grand nombre de bronchites chroniques dans la plupart des secteurs agricoles où il y a une exposition importante aux particules organiques, telles que les poussières végétales et les toxines bactériennes ou fongiques. Des cas de BPCO sont recensés chez les ouvriers des silos à grains de certains élevages de porcins et de bovins.

Des études ont également montré un excès de bronchites chroniques chez les personnes travaillant dans les mines (charbon, fer...), l'industrie du bois, les travaux publics (exposition à des concentrations élevées de poussières minérales, gaz, particules diesel, huiles minérales), les cimenteries et la sidérurgie.

3.4.4. *Le facteur génétique*

De nombreux facteurs génétiques influencent le risque de développer une BPCO. Le mieux documenté est le déficit héréditaire de la protéine alpha-1 antitrypsine ($\alpha 1$ -AT) (Eriksson, 1964). L' $\alpha 1$ -AT est un inhibiteur de protéase, sécrété par les hépatocytes. Il est important dans le maintien de l'intégrité du parenchyme pulmonaire. Sa principale action est d'inhiber l'élastase libérée par les polynucléaires neutrophiles particulièrement lors d'épisodes inflammatoires ou infectieux. Chez le sujet sain, le poumon est protégé de l'action de l'élastase des polynucléaires neutrophiles par la présence en quantité importante d'alpha-1 antitrypsine. Dans sa forme typique, le déficit homozygote se manifeste par une dyspnée progressive, s'installant avant l'âge de 30-40 ans chez un homme fumeur, une diminution du VEMS, suivi

d'un emphysème précoce. On retrouve cette anomalie chez 1 à 3% des sujets atteints de BPCO.

La découverte du rôle de cet inhibiteur dans la BPCO a conduit à l'hypothèse du déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase. Hypothèse selon laquelle il existerait un déséquilibre entre les enzymes de dégradation de la MEC et ses inhibiteurs conduisant au développement d'un emphysème précoce (Gooptu et al., 2009; Marciniak and Lomas, 2009).

Le polymorphisme génétique des gènes impliqués dans l'homéostasie de la MEC ainsi que des gènes impliqués dans la production d'enzymes de détoxification telles que la glutathion transférase, l'hème oxygénase 1 et la superoxyde dismutase, sont également suspectés d'être impliqués dans la pathologie des maladies BPCO (Marciniak and Lomas, 2009)

3.5. Exacerbations

L'exacerbation de la BPCO est délétère pour le patient. Néfaste elle conduit à l'accélération de la progression de la maladie et à des coûts de santé élevés. Une exacerbation de la BPCO est définie comme un événement aiguë d'installation brutale caractérisé par une aggravation de la dyspnée, de la toux et des expectorations au-delà des variations quotidiennes et nécessitant une prise en charge thérapeutique spécifique (GOLD, 2006). Des épisodes d'exacerbation répétés conduisent à une dégradation de la qualité de vie, à une insuffisance respiratoire et à la mort prématurée du patient (Connors et al., 1996; Donaldson et al., 2002; Seemungal et al., 1998)

Les principaux agents responsables sont des bactéries, des infections virales, ou une combinaison des deux. Des causes non infectieuses sont aussi décrites (pollution de l'air, embolie pulmonaire) et chez certains patients, aucune cause n'est identifiée (Papi et al., 2006a).

Une grande partie des exacerbations d'origine virale sont associées au virus respiratoire syncytial et au virus influenza. Environ 25% des patients admis à l'hôpital avec une exacerbation de BPCO avaient une co-infection bactérienne et virale conduisant à des symptômes plus sévères, tels que mesurés par la durée d'hospitalisation. Ceci suggère que les patients co-infectés par un virus et les bactéries peuvent avoir des exacerbations plus sévères (Papi et al., 2006a).

Plusieurs auteurs montrent que la colonisation de l'arbre trachéobronchique, principalement par des bactéries Gram-négatives, contribue à ce processus inflammatoire et à l'aggravation progressive de la BPCO (Patel et al., 2002; Zalacain et al., 1999). Selon certaines hypothèses des épisodes des infections bactériennes répétées représenteraient la première cause d'exacerbation de cette maladie. Ces exacerbations sont marquées par une augmentation du nombre de cellules inflammatoires et de cytokines qui sont déjà augmentées dans la BPCO stable. Les mécanismes communs d'exacerbations cellulaires et moléculaires ne sont pas encore bien compris, mais des études suggèrent qu'ils sont dus à l'amplification du processus inflammatoire déclenché par des bactéries, les virus et des stimuli non infectieux, tels que la pollution de l'air (Anderson et al., 1997; Celli and Barnes, 2007; Sethi et al., 2006).

3.6. Physiopathologie de la BPCO

La BPCO conduit à des altérations physiologiques caractérisées par une hypersécrétion de mucus, une dysfonction ciliaire, une limitation du débit aérien, une hyperinflation pulmonaire, des anomalies dans les échanges gazeux et une hypertension pulmonaire. Ces phénomènes se développent habituellement dans cet ordre au cours de la maladie. L'hypersécrétion de mucus et la dysfonction ciliaire conduisent à une toux chronique et à la production d'expectorations. Ces symptômes peuvent être présents pendant de nombreuses années avant que d'autres symptômes et anomalies physiologiques se développent. La bronchite chronique et l'emphysème sont des caractéristiques de la BPCO sévère.

La progression de la bronchite entraîne des modifications morphologiques irréversibles des espaces aériens distaux. Une inflammation persistante des bronchioles, les canaux alvéolaires et des alvéoles est à l'origine de la destruction des *septa* alvéolaires. Cela se traduit par une augmentation permanente des espaces aériens, aussi connue comme l'emphysème, conduisant à une réduction des zones d'échange de gaz, et par conséquent à une baisse de la pression artérielle partielle d'oxygène (PaO_2) et à une hausse de la pression artérielle partielle de dioxyde de carbone (PaCO_2) (Caneva et al., 2001; Carolan and Sutherland, 2013). De plus, le processus de réparation peut avoir pour résultat, un épaississement des parois des bronches et bronchioles (Hogg, 2004)

3.7. Mécanismes cellulaires et moléculaires

Les poumons représentent une interface avec l'environnement extérieur d'une surface d'environ 75m². Cette surface est nécessaire pour les échanges gazeux, mais rend le poumon vulnérable vis-à-vis des pathogènes, des particules et des gaz toxiques inhalés. La reconnaissance des agressions de l'environnement au niveau des poumons est cruciale dans le déclenchement de la réaction inflammatoire et le recrutement des cellules immunitaires. Des leucocytes tels que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes vont être recrutés grâce aux chimiokines qui sont produites par les cellules présentes sur le site inflammatoire (Barnes, 2003). Les cellules épithéliales pulmonaires, les leucocytes ainsi que les cytokines jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire et donc dans le développement de la BPCO. Nous discuterons ici du rôle des cellules épithéliales, des leucocytes et ensuite des cytokines (Barnes, 2000).

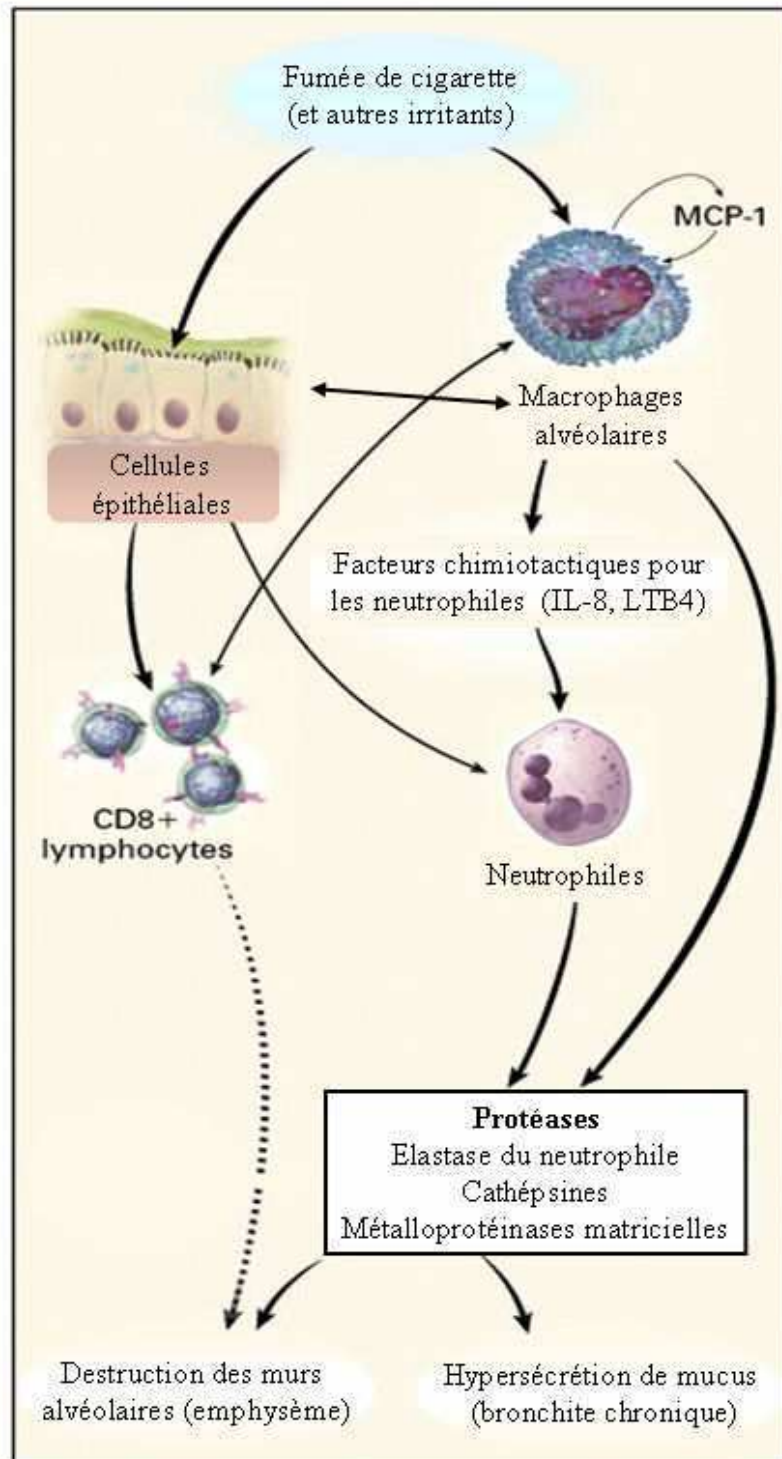


Figure 8: Mécanisme cellulaire de la BPCO.

(D'après Barnes, 2000)

3.7.1. *Les cellules impliquées*

3.7.1.1. Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales des voies aériennes sont importantes pour la défense des voies respiratoires, mais cette fonction de barrière peut être altérée par une exposition à la fumée de cigarette. En effet, une augmentation de la perméabilité de l'épithélium est observée après une exposition à la fumée de cigarette (Olivera et al., 2007; Rusznak et al., 2000). Elle provoque également une activation des cellules épithéliales pulmonaires qui mettent alors en place des mécanismes de défense comme la sécrétion de mucus, l'augmentation de la fréquence des battements ciliaires, la production d'espèces activées de l'oxygène et le chimiotactisme de cellules inflammatoires (Maestrelli et al., 2001). Les cellules épithéliales bronchiques sont en effet une source importante de médiateurs inflammatoires tels que MCP-1/CCL2 (Monocytes Chemotactic protein-1), Gro- α /CXCL1 (Growth Related oncogene- α), TNF- α (Tumor Necrosis Factor) et IL-8/CXCL8 (Interleukine-8) (Traves et al., 2002), et de molécules d'adhérence comme I-CAM1 (Intra-Cellular Adhesion Molecule-1), impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires (Rusznak et al., 2000)

La production de chimiokines par les cellules épithéliales des voies aériennes est en grande partie stimulée par des endotoxines, des cytokines et par la fumée de cigarette (Becker et al., 1994; Koyama et al., 1991; Zhang et al., 2011). L'épithélium représente également une cible pour les cytokines libérées par les cellules inflammatoires, il devient par conséquent un effecteur majeur de l'inflammation agissant de manière autocrine ou paracrine pour propager l'activation (Adler et al., 1994). Par exemple, l'IFN- γ , l'IL-1 β ou le TNF- α peuvent déclencher une production de médiateurs lipidiques (prostaglandines PGE 2 et leucotriènes) ainsi que d'autres cytokines (IL-6 et IL-8/CXCL8) et des espèces activées de l'oxygène (EAO) par les cellules épithéliales (Kampf et al., 1999; Martin et al., 1997; Miyajima et al., 2005). Enfin, ces dernières peuvent aussi être activées par les protéases (Le Quement et al., 2008; Witherden et al., 2004). Ce type de cellule ne se limite donc pas qu'à une fonction de barrière physique, c'est aussi une cellule endocrine capable de participer au processus inflammatoire.

3.7.1.2. Les macrophages et monocytes

Les macrophages alvéolaires sont des cellules résidentes des poumons. Ils sont capables de répondre de façon précoce aux toxines inhalées par leur activité de phagocytose et d'élimination des irritants indésirables. La phagocytose est un système de défense important qui permet de neutraliser les particules toxiques de la fumée. Chargés de ces particules, les macrophages quittent le poumon *via* les battements ciliaires et la production de mucus ou *via* le système lymphatique. Mais chez les patients atteints de BPCO, le nombre de macrophages alvéolaires est augmenté, ceci étant mis en évidence après numération du liquide de lavages bronchoalvéolaires et des expectorations. (Barnes, 2004b; Di Stefano et al., 1998; Wallace et al., 1992). Une analyse morphométrique du parenchyme de patients présentant un emphysème a montré que le nombre de macrophages dans le tissu et les espaces alvéolaires est multiplié par 25 par rapport à des fumeurs sains (Retamales et al., 2001). Cette accumulation de macrophages est corrélée avec la sévérité de la BPCO (Chen et al., 2003). Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer ce phénomène, comme par exemple, la diminution de l'efficacité du système muco-ciliaire chez les fumeurs. Alternativement, le système lymphatique pulmonaire peut être réduit suite à un dommage tissulaire ou simplement être incapable de traiter l'afflux pulmonaire accru (Tetley, 2002). Le nombre croissant de macrophages au sein du poumon chez les patients BPCO peut être également expliqué par une prolifération mais aussi une survie prolongée de ces cellules (Tomita et al., 2002).

De plus, l'activation des cellules résidentes (macrophages alvéolaires, cellules épithéliales) par un extrait de fumée de cigarette conduit à la libération de médiateurs inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-8/CXCL8 et d'autres chimiokines responsables du recrutement de monocytes circulants et d'autres cellules inflammatoires (Traves et al., 2002). Ces monocytes, après avoir traversé la barrière endothéliale et être arrivés dans le tissu pulmonaire, se différencient et prennent le phénotype de macrophage, qui participe à l'entretien de la réaction inflammatoire.

Les macrophages alvéolaires sécrètent aussi des enzymes élastolytiques comme les métalloprotéases de la matrice : MMP-2, MMP-9, MMP-12, cathepsines K, L et S après contact avec la fumée de cigarette. Ces protéases contribuent au remodelage tissulaire en dégradant la matrice extracellulaire (MEC) (Silvestre and Levy, 2002).

3.7.1.3. *Les neutrophiles*

Les neutrophiles jouent un rôle très important dans le développement de la BPCO, car ces cellules sont les premières recrutées sur le site après l'exposition à la fumée de cigarette. De nombreuses études *in vivo* s'accordent sur l'observation d'un afflux très précoce de neutrophiles dans les voies aériennes (Churg et al., 2002; Dhami et al., 2000; Hautamaki et al., 1997; Hulbert et al., 1985; Leclerc et al., 2006). Ces cellules présentent, dans les tissus, une durée de vie très courte (1 à 2 jours), contrairement aux macrophages capables de vivre plus d'un mois. Une augmentation du nombre de neutrophiles activés est mesurée dans les expectorations forcées et dans le liquide de la LBA de patients atteints de BPCO (Keatings et al., 1996; Lacoste et al., 1993), mais celle-ci est relativement plus faible que dans les voies respiratoires ou que dans le parenchyme pulmonaire (Finkelstein et al., 1995).

Le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires ainsi que dans le parenchyme, implique leur adhérence aux cellules endothéliales par les molécules d'E-sélectine, dont l'expression est augmentée dans les voies respiratoires chez les patients atteints de la BPCO (Di Stefano et al., 1994). Les Neutrophiles adhérents migrent ensuite dans le tractus respiratoire par chimiotactisme (Noguera et al., 2004). Le recrutement est lié notamment à la production de facteurs chimiotactiques tels que l'interleukine-8 (IL-8/CXCL8) par les macrophages, les cellules épithéliales et les neutrophiles eux-mêmes, mais aussi lié à la libération du (leucotriène B4) LTB4 et de la chimiokine Gro- α /CXCL1 (Growth Related Oncogene- α) (Bazzoni et al., 1991; Tanino et al., 2002; Traves et al., 2002).

Ces cellules possèdent des granules contenant des molécules pro-inflammatoires (protéases) et antimicrobiennes (protéases, lysozymes) qui sont requises lors d'une infection par un pathogène. Arrivés sur le site inflammatoire, les neutrophiles ont la capacité de libérer ces protéases comme les protéinases à sérine : l'élastase du neutrophile, la cathepsine G et la protéinase-3. Ils contiennent aussi deux MMPs : la collagénase (MMP8) et la gélatinase B (MMP9) qui, en association avec les protéases à sérine, peuvent dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire (Owen, 2008). Ces sérines protéases sont aussi des stimulants puissants de la production de mucus (Park et al., 2005).

Le rôle des neutrophiles dans la BPCO n'est pas encore clair, mais il a été démontré que le nombre de neutrophiles dans les biopsies bronchiques et des expectoration forcées sont en corrélation avec la sévérité de la BPCO (Di Stefano et al., 1994; Keatings and Barnes, 1997) de même qu'avec la diminution de la fonction pulmonaire (Stanescu et al., 1996).

Cependant, il existe une corrélation négative entre le nombre de neutrophiles et le niveau de destruction alvéolaire dans la BPCO (Sparrow et al., 1984).

3.7.1.4. Les lymphocytes

L'infiltration de lymphocytes T, chez les patients BPCO, a été décrite par Finkelstein et ses collaborateurs, qui ont montré une corrélation entre la quantité de lymphocytes T par mm³ de poumon et l'ampleur de l'emphysème (Finkelstein et al., 1995). Il a ensuite été observé que le nombre de cellules CD4⁺ (T helper) et CD8⁺ (T cytotoxique/suppresseur) augmente dans le parenchyme pulmonaire et dans les voies aériennes centrales et périphériques de patients atteints de BPCO, avec une prédominance des CD8⁺ (O'Shaughnessy et al., 1997; Saetta et al., 1999). Cette infiltration de lymphocytes T CD8⁺ semble corrélée à la sévérité de l'obstruction de voies aériennes (Saeta *et al.*, 1999). Ces cellules CD8⁺ peuvent être cytotoxiques, en libérant des perforines et des granzymes qui induisent la mort des cellules épithéliales. La perforine va s'insérer dans la membrane de la cellule cible et y créer des pores. La formation de ces pores n'est pas suffisante pour tuer la cible mais va plutôt permettre l'entrée des granzymes dans la cellule. Les granzymes sont des protéases qui vont cliver de nombreux substrats dans la cellule cible et conduire à la mort de celle-ci. Par ailleurs, un second mécanisme met en jeu la protéine FasL, membranaire ou sécrétée par le lymphocyte T, qui va se fixer sur un récepteur Fas (FasR) situé sur la cible. La liaison de FasL à FasR va déclencher un programme intracellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule cible. Des concentrations importantes de perforines et une apoptose accrue des cellules alvéolaires ont été mesurées dans des expectorations de patients atteints de BPCO (Chrysofakis et al., 2004; Majo et al., 2001)

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent aussi un rôle dans la réponse adaptative au cours de la BPCO. Cette réponse est caractérisée par la synthèse d'interféron gamma et d'IL-2. Les hauts niveaux d'interféron gamma dans le poumon de souris adulte conduisent au développement d'un emphysème (Wang et al., 2000)

3.7.1.5. Les éosinophiles

L'éosinophile ne semble pas être impliqué dans la BPCO, contrairement à l'asthme. On note néanmoins dans certains cas, une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires (LBA) de patients présentant une BPCO stable. La présence d'éosinophiles chez ces patients peut parfois être le signe d'un asthme co-existant (Saha and Brightling, 2006). Par ailleurs, plusieurs études s'accordent à dire qu'une augmentation du nombre d'éosinophiles peut être observée aux cours des exacerbations (Papi et al., 2006a; Papi et al., 2006b; Saetta et al., 1996)

3.7.2. *Les médiateurs impliqués*

3.7.2.1. Les cytokines

Les cytokines sont des substances de communication solubles synthétisées par les cellules, et agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Puisque l'inflammation chronique tient une place importante dans la BPCO, il n'est pas étonnant que les cytokines jouent un rôle clé dans l'orchestration de l'inflammation chronique. Le rôle potentiel des cytokines dans la BPCO a été mis en évidence par plusieurs travaux effectués chez l'Homme et chez la souris. Plus de 50 cytokines ont été identifiées dans la BPCO (Yamaya and Osanai, 2011). Dans les paragraphes suivants nous décrivons celles que semblent le plus important.

3.7.2.1.1. Tumor necrosis Factor- α (TNF- α)

De nombreuses cellules ont la capacité de sécréter du TNF- α , parmi celles-ci, les cellules épithéliales, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules musculaires lisses des voies aériennes. Les niveaux TNF- α sont augmentés dans les expectorations forcées de patients atteints de BPCO, en particulier pendant les exacerbations (Keatings et al., 1996). Le TNF- α a également été fortement impliqué dans l'emphysème induit par la fumée de cigarette chez la souris (Churg and Wright, 2007). Il serait même responsable de 70% de l'emphysème pulmonaire induit par une exposition à la fumée de cigarette (Churg et al., 2004).

3.7.2.1.2. L'interleukine-1 β (IL-1 β)

Une augmentation de la concentration en interleukine-1(IL-1 β) dans les expectorations forcées de patients BPCO a été également décrite, ainsi que sa corrélation avec la sévérité de la maladie. C'est ce qui suggère que l'IL-1 β peut jouer un rôle crucial dans la BPCO. De plus, des antagonistes endogènes de l'IL-1 β apparaissent réduits dans la BPCO (Sapey et al., 2009). Cette cytokine est capable d'activer les macrophages de patients atteints de BPCO, entraînant une augmentation de la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires, de chimiokines et de métalloprotéases (MMP) 9 (Culpitt et al., 2003).

3.7.2.1.3. L'interleukine-6 (IL-6)

L'interleukine-6 (IL-6) est augmentée dans les expectorations forcées, l'air expiré, et le plasma de patients atteints de BPCO, en particulier pendant les exacerbations. Cette cytokine fonctionne souvent avec d'autres cytokines et contrairement à la plupart, celle-ci est stable dans la circulation. Elle peut être donc impliquée dans quelques-unes des caractéristiques systémiques de la BPCO. De plus, l'IL-6 fournit aussi un lien entre l'immunité innée et acquise (Bhowmik et al., 2000; Bucchioni et al., 2003).

3.7.2.2. Les chimiokines

Le trafic des cellules immunitaires vers les sites d'infection et de l'inflammation est sous le contrôle étroit d'une classe spéciale de cytokines avec des propriétés chimiotactiques, les chimiokines. Les chimiokines sont classées en quatre groupes, en fonction de la position de leurs résidus cystéine en position N-terminale. Les membres de la famille CC (β -chimiokines) possèdent deux premières cystéines adjacentes; ceux de la famille CXC (α -chimiokines) contiennent un acide aminé entre les deux premières cystéines. Dans la famille CX3C (δ -chimiokines), les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés. La famille C (γ -chimiokines) ne contient qu'une seule cystéine. Les chimiokines sont produites par la majorité des cellules. Elles se fixent à plusieurs types de récepteurs exprimés sur de nombreux types cellulaires.

Leurs récepteurs sont divisés en deux grands types : les récepteurs CC (CCR) et les récepteurs CXC (CXCR). Toutes les chimiokines exercent leur fonction en se fixant sur des

récepteurs couplés aux protéines G. Il existe au moins 10 sous types de récepteurs CCR (β) et sept CXCR (α). Ces récepteurs montrent souvent une spécificité pour plus d'un ligand. La fixation de la chimiokine sur son récepteur entraîne plusieurs voies de signalisation comme la voie des MAP kinases, tyrosine kinases et les sérine-thréonine kinases (Devalaraja and Richmond, 1999; Schwarz and Wells, 2002).

La première chimiokine identifiée dans la BPCO a été CXCL8, mais depuis, d'autres chimiokines ont été mises en évidence. Trois d'entre elles dont les taux sont augmentés dans les liquides bronchoalvéolaires de sujets fumeurs comparé à des non fumeurs sont décrites ci-dessous (Keatings et al., 1996; Kuschner et al., 1996; Lacoste et al., 1993).

3.7.2.2.1. L'interleukine 8 (IL-8/CXCL8)

L'IL-8/CXCL8 (Interleukine 8) est une cytokine appartenant à la famille des chimiokines C-X-C. Elle est synthétisée par les cellules épithéliales et macrophages en réponse à divers stimuli tels que le TNF- α , l'IL-1 β , le LPS, certains virus, les espèces activées de l'oxygène et la fumée de cigarette (Gallelli et al., 2010; Mulligan et al., 2009; Rossol et al., 2011). L'IL-8/CXCL8 est dotée d'un pouvoir chimiotactique principalement envers les neutrophiles mais aussi envers les monocytes, basophiles, lymphocytes T, kératinocytes et cellules endothéliales. Elle interagit avec ces cellules grâce à deux récepteurs appartenant à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G : CXCR1 et CXCR2 (Schwarz and Wells, 2002).

Keatings (1996) et ses collaborateurs ont montré une augmentation des concentrations de TNF- α et d'IL-8/CXCL8 dans les expectorations forcées des patients atteints de BPCO en comparaison à des patients fumeurs, mais avec une fonction pulmonaire normale et des patients non-fumeurs. De plus, ils montrent une corrélation entre l'augmentation de ces cytokines et le nombre de neutrophiles dans les expectorations (Keatings et al., 1996; Lacoste et al., 1993)

3.7.2.2.2. Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1/CCL2).

La Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1/CCL2) active le récepteur CCR2 sur les monocytes et les lymphocytes T. Cette chimiokine est également sécrétée par différents types de cellules, comprenant les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales, les cellules musculaires, les lymphocytes T et les fibroblastes. Elle est aussi un puissant facteur chimiotactique des monocytes (de Boer et al., 2000; Traves et al., 2002; Traves et al., 2004). De plus, MCP-1/CCL2 peut induire la libération de différentes cytokines, telles que le TNF- α et IFN- γ , donc MCP-1/CCL2 est impliquée dans l'accumulation de macrophages (Rolfe et al., 1992; Standiford et al., 1991). D'autres effets de la MCP-1/CCL2 incluent la stimulation de l'endothélium, la cicatrisation des plaies, la migration des cellules endothéliales, l'angiogenèse, l'augmentation du volume du muscle lisse vasculaire (hyperplasie), l'augmentation de collagène et de TGF- β par les fibroblastes. La MCP-1/CCL2 peut aussi avoir un effet autocrine sur les cellules épithéliales (Furukawa et al., 1999; Salcedo et al., 2000; Weber et al., 1999). Ces données confirment le rôle majeur de la MCP-1/CCL2 dans le remodelage et dans l'inflammation des voies aériennes, d'une manière directe, ou par l'intermédiaire des macrophages.

3.7.2.2.3. Growth Related Oncogene- α (Gro- α /CXCL1)

Gro- α /CXCL1 (Growth Regulated Oncogene-alpha) est une cytokine appartenant également à la famille des chimiokines C-X-C. Elle est capable d'activer les neutrophiles, les monocytes, les basophiles et les lymphocytes T *via* le récepteur CXCR2 et CXCR1. Comme l'IL-8/CXCL-8, elle possède une activité chimiotactique envers les neutrophiles et les monocytes. En plus de ses propriétés chimiotactiques, la Gro- α /CXCL1 peut être impliquée dans la cicatrisation des plaies et dans l'angiogenèse (McColl and Clark-Lewis, 1999; Mukaida et al., 1998a). Différents auteurs ont pu mettre en évidence que le TNF- α , l'IL-8/CXCL-8 et Gro- α /CXCL1 entraînent une dégranulation de neutrophiles ainsi qu'un stress oxydant, pouvant être à l'origine d'une dégradation de la matrice et du tissu épithélial (Jones et al., 1997).

Les CCL3/MIP-1 α , CCL4 /MIP-1 β , et CCL5 qui possèdent un récepteur commun le CCR5, semblent aussi être impliquées dans la physiopathologie de la BPCO. En effet, les

lymphocytes T exprimant CCR5 sont augmentés d'une manière légère à modérée dans les voies respiratoires des patients atteints de BPCO et dans les expectorations de ces patients. De plus, CCR5 contribue au recrutement de ces cellules dans les voies respiratoires des ces patients (Costa et al., 2008; Di Stefano et al., 2001).

Les lymphocytes T des voies aériennes des patients atteints de BPCO présentent une augmentation de l'expression de CXCR3 activée par le MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11). Une fois activés, les lymphocytes libèrent des chimiokines capables d'attirer d'autres cellules CD8+ et CD4+. Il en résulte donc une boucle « d'auto-attraction » qui peut expliquer l'accumulation de lymphocytes au niveau des poumons (Barnes and Cosio, 2004).

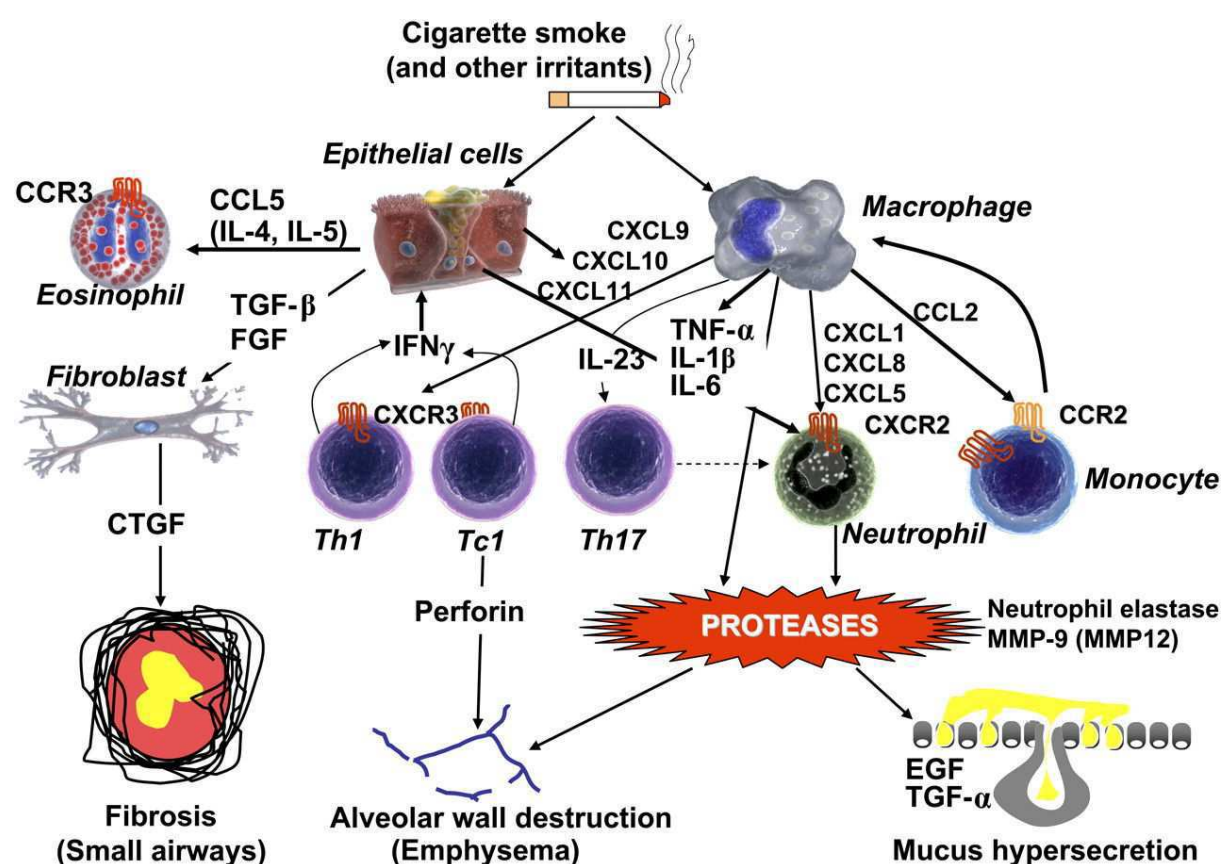


Figure 9: Représentation schématique du réseau des cytokines dans la BPCO

(D'après: Barnes, 2009)

Dans le but de comprendre le processus inflammatoire sous-jacent et d'identifier des cibles pour le développement de nouveaux traitements anti-inflammatoires, différentes études sur le rôle des cytokines, des chimiokines, dans la BPCO ont été réalisées. Les cytokines jouent un rôle clé dans l'orchestration de l'inflammation chronique, et plus de 50 cytokines ont été identifiées dans la BPCO. Elles travaillent dans des réseaux complexes qui interagissent,

et il y a souvent une redondance dans leurs fonctions. Ce réseau est complexe, car les cytokines peuvent avoir des actions différentes, voire opposées, en fonction du contexte inflammatoire présent ou dans différents types cellulaires (Figure 9). Ainsi, malgré les travaux étendus qui montrent une augmentation de cytokines chez le patient de la BPCO, leur rôle dans cette pathologie complexe est encore mal connu (Barnes, 2009).

3.7.3. Les voies de signalisation impliquées

Confrontées aux changements de leur environnement, les cellules doivent être capables de détecter et d'intégrer ces modifications pour produire une réponse adéquate grâce à un vaste réseau de voies de signalisation intracellulaires. Les stimuli extérieurs sont perçus par l'intermédiaire de diverses structures membranaires, puis un signal est initié et se propage vers les structures les plus profondes de la cellule. Cette propagation du signal implique des activations en cascade de nombreuses molécules. Toute la machinerie cellulaire est alors mobilisée pour permettre l'émergence d'une réponse appropriée. Ces réponses peuvent intervenir sur la prolifération, la différenciation cellulaire ou favoriser une réaction inflammatoire.

Les cytokines jouent un rôle très important dans l'inflammation et donc dans la physiopathologie de la BPCO. La régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines implique de nombreuses voies de signalisation.

Il existe plusieurs cascades de kinases qui permettent la transmission des stimuli extérieurs, mais cette section est consacrée aux voies MAP kinases (« *Mitogen Activated Protein kinases* »), JAK/STAT (« *Janus Kinases / signal transducers and activators of transcription* ») et SFKs (« *Src Family of protein tyrosine Kinase* »)

3.7.3.1. Les voies MAP kinases (« *Mitogen Activated Protein kinases* »).

Les « *Mitogen Activated Protein Kinases* » ou MAP Kinases constituent un groupe de sérine/thréonine kinases, activées en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires (virus, bactéries, cytokines, facteurs de croissance, hormones). Une fois activées, les MAP kinases permettent une amplification rapide du signal initial et sa transduction depuis la surface de la cellule jusqu'au noyau. Cette transmission du signal s'effectue par des cascades de phosphorylations, aboutissant à terme à une activation de facteurs de transcription, permettant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et l'inflammation (Adcock et al., 2006).

Les trois principales familles de MAP kinases majoritairement décrites dans la littérature sont la voie ERK (« *Extracellular signal-regulated kinase* »), JNK (« *c-jun NH2-terminal kinase* ») et p38 (Figure 10).

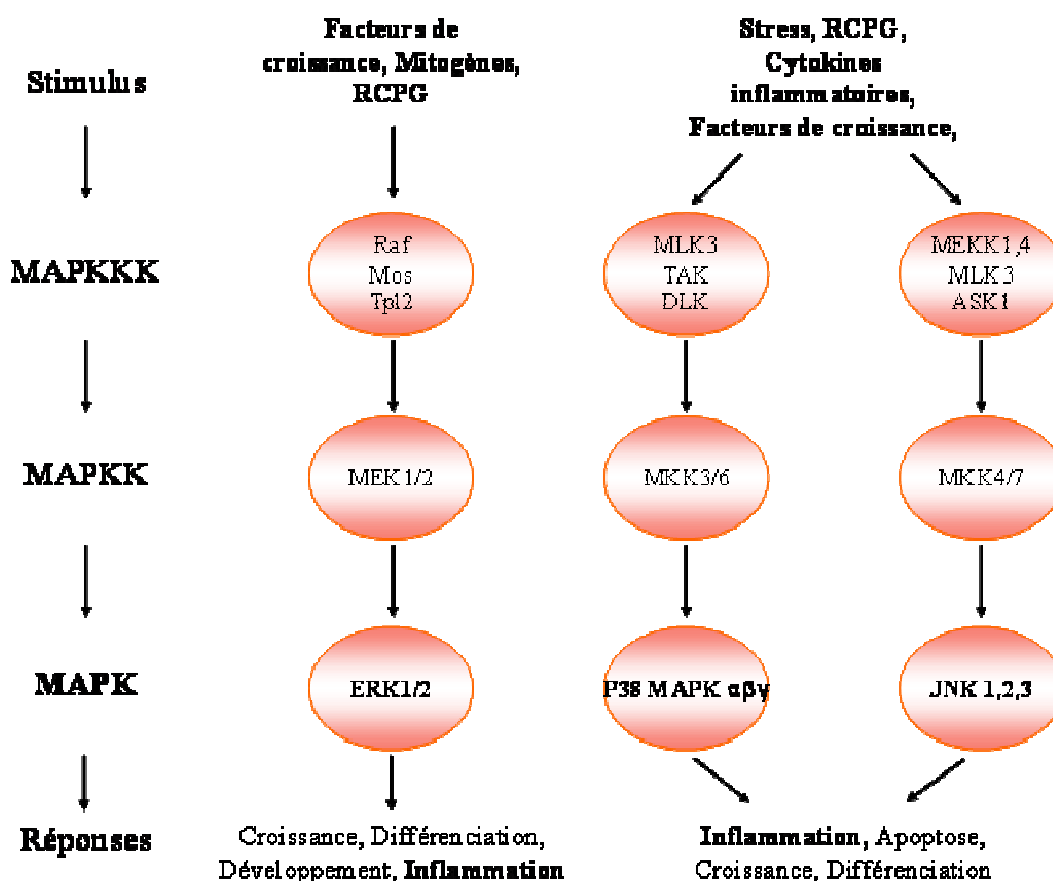


Figure 10 : Voies de signalisation des «Mitogen Activated Protein Kinases» (MAP Kinases)

(D'après: <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>)

- La voie "Extracellular signal-regulated kinase" (ERK-1/ERK-2)

D'une façon générale, la voie ERK1/2 est activée par la fixation d'un ligand, tel l'EGF, qui se lie à son récepteur à tyrosine kinase (EGFR), entraînant ainsi la formation du complexe actif Ras. Les molécules adaptatrices Grb2 et SOS sont responsables d'une perte d'affinité pour le GDP qui est alors libéré dans le cytoplasme et aussitôt remplacé par la liaison d'une molécule de GTP sur le même site. Le complexe actif Ras-GTP se lie au domaine régulateur de Raf, qui phosphoryle et active ainsi MEK, qui active par la suite ERK1/2.

Dans de nombreux cas, les ERK peuvent également être activées d'une manière indépendante de Ras, par des stimuli pro-inflammatoires incluant le TNF- α , des PAMPs, tels que le lipopolysaccharide, et par des DAMPs, tels que les lipoprotéines oxydées de basse densité dans le cas de l'athérosclérose et d'acide urique dans le cas de la goutte. Lorsque la

protéine ERK1/2 est phosphorylée, elle peut traverser la membrane nucléaire pour phosphoryler les facteurs de transcription Elk1, SAP et PPAR γ ou encore des protéines cytosoliques comme la phospholipase A2 (PLA2). D'autres cibles d'ERK sont décrites, comme la protéine kinase RSK2. Celle-ci peut activer le facteur de transcription CREB. CREB est également activé par phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique (Iqbal and Zaidi, 2005; Marinissen and Gutkind, 2001; Matthews and O'Neill, 1999; Park et al., 1999; Sohn et al., 2007). De plus, les protéines ERK sont également activées par une up régulation de la Scr Family ou par l'activation de récepteurs de chimiokines couplés à la protéine G (Ovrevik et al., 2004; Parsons and Parsons, 2004).

Enfin, une fois activée, la voie ERK peut être inactivée par des mécanismes de rétrocontrôle induits par eux-mêmes ou par leurs substrats. En effet, ERK1/2 est inhibée par déphosphorylation par les MAP kinases phosphatases, dont l'expression est contrôlée par ERK1/2 ou leurs substrats. La voie de ERK1/2 peut être également inactivée après l'inhibition de SOS, (une des *upstream* protéines impliquées dans l'activation de la voie RAS-MAPK), suite sa phosphorylation par RSK2, un substrat d'ERK (Zassadowski et al., 2012) (Figure 11).

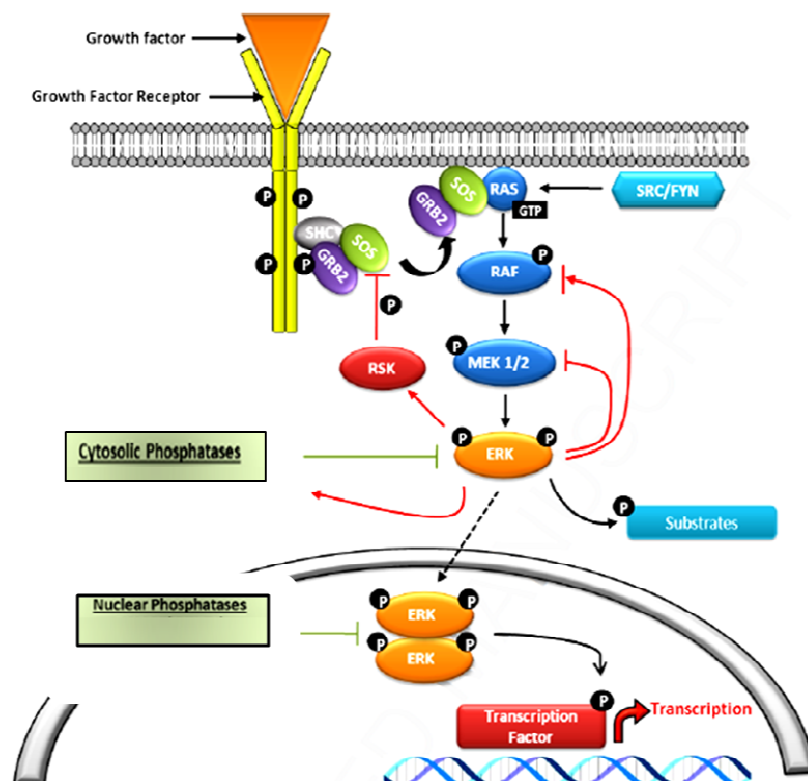


Figure 11: Voies de signalisation des *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK-1/ERK-2)

(D'après <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>)

- JNK (« *c-jun* NH2-terminal kinase »

La protéine JNK a été initialement identifiée comme une protéine kinase purifiée à partir de foies de rats traités par le cycloheximide, un antifongique qui bloque la synthèse protéique. Cette MAP kinase est activée pendant la mitogénèse, mais elle peut être aussi activée par des stress environnementaux (choc thermique, radiations UV, les oxydants), par des génotoxiques, par des peptides vasoactifs, par des cytokines pro-inflammatoires et finalement par des PAMP/DAMP.

L'activation de cette MAP kinase est médiée par deux petites protéines G, Rac et cdc42. Toutes deux peuvent activer MEKK1,4 (Erk Kinase Kinase 1,4) qui phosphoryle MKK4. Des activations de MKK4/7 par les protéines MLK3 (Mixed Lineage Kinase-3) et ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) sont également décrites. MKK4/7 peut ensuite phosphoryler JNK qui pourra à son tour activer des facteurs de transcription comme c-Jun, protéine activatrice-1 (AP-1), ATF-2, etc (Alvarez, 2005). Les JNK sont codées par trois gènes JNK 1-3 et possèdent trois isoformes (Yang et al., 2013). JNK1 semble participer à la phosphorylation de c-jun alors que JNK2 régulerait plutôt la stabilité de ce facteur de transcription (Sabapathy et al., 2004). Finalement JNK 3 est exprimée dans les neurones du système nerveux central (Probst et al., 2011).

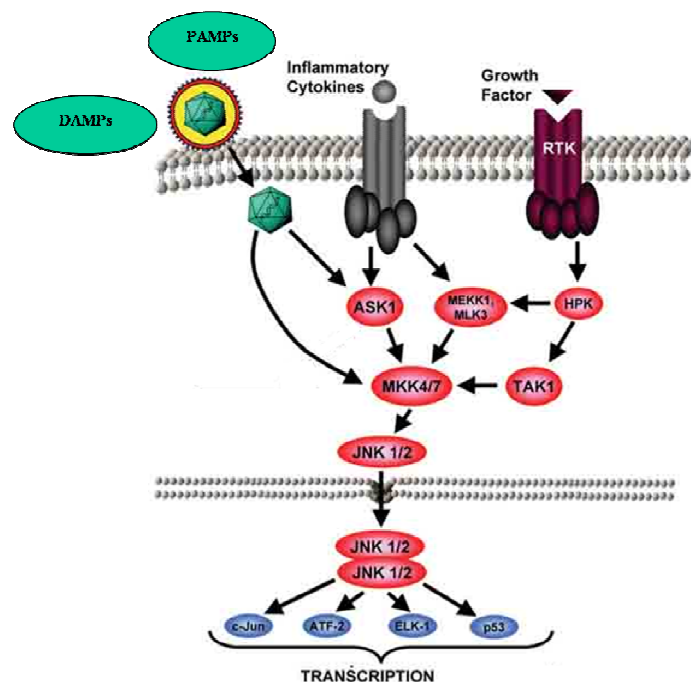


Figure 12 : Représentation schématique de la voie de signalisation JNK

(Adapté d'Alvarez *et al.*, 2005)

- p38

La kinase p38 est activée en réponse à des cytokines inflammatoires, des endotoxines (LPS) et des stress osmotiques. Pour résumer, les kinases MLK et TAK peuvent activer MKK3/6 qui phosphoryle p38. p38 activée favorisera notamment l'action des facteurs ATF-2, CREB, Stat3, Elk1, c-Myc et NF- κ B. La famille MAP Kinase p38 est composée de 4 enzymes : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . En particulier, la voie p38 α est bien caractérisée par son rôle dans la production de cytokines dans les cellules immunitaires (Hashimoto et al., 1999a; Hashimoto et al., 1999b; Lee et al., 1994). Cette voie peut être activée non seulement par un stress cellulaire tel qu'un choc osmotique, mais aussi par des facteurs de croissance, les rayonnements UV, les ligands des récepteurs couplés aux protéines G et des hormones.

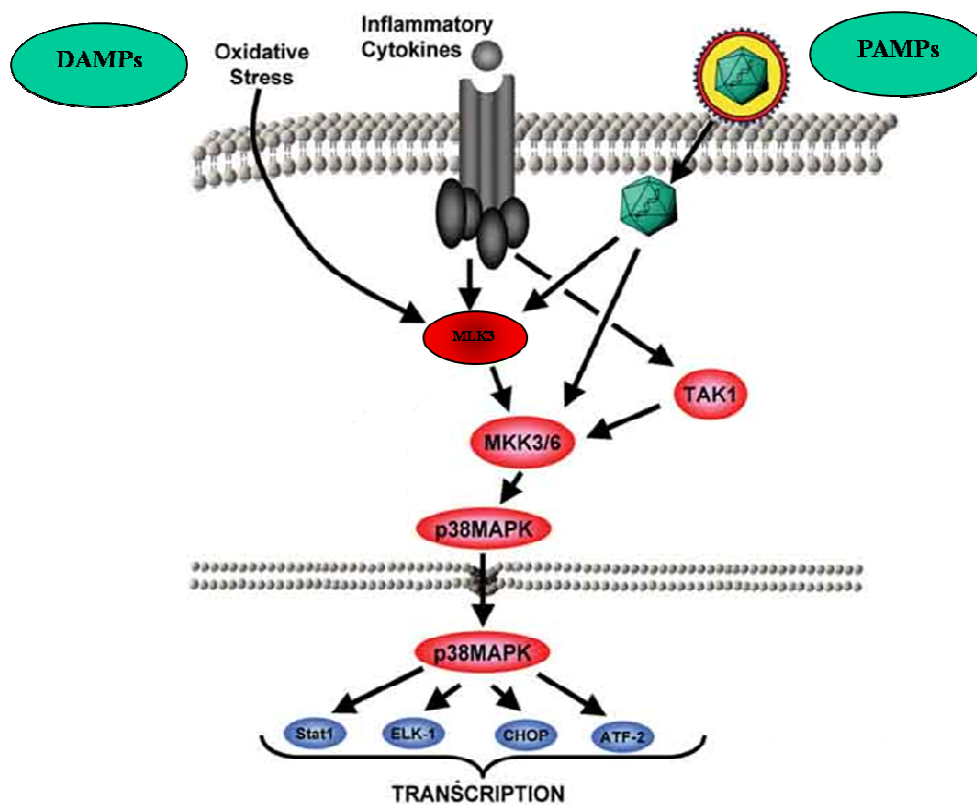


Figure 13: Représentation schématique de la voie de signalisation p38

(Adapté d'Alvarez *et al.*, 2005)

Comme précédemment expliqué, le signal de transduction des MAP Kinases est sous la dépendance de différents stimuli, puis s'ensuit une interaction avec des récepteurs transmembranaires tels que les récepteurs à tyrosine kinase ou les « RCPG ». Il est bien connu que la fumée de cigarette est un de ces stimuli, en revanche les récepteurs et les mécanismes

impliqués restent inconnus. En fait, l'exposition à la fumée de cigarette est associée à une induction de différentes cytokines pro-inflammatoires, par exemple la production d'IL-8/CXC8, qui est dépendante de la voie ERK 1/2 (Lau et al., 2011). Le récepteur EGFR semble être le responsable de cette activation (Li et al., 2007). Bien que les MAP kinases aient individuellement montré leur rôle essentiel dans la physiopathologie de la BPCO, la complexité de leur mécanisme et leurs différentes interactions compliquent leur étude et la compréhension globale du rôle qu'elles jouent dans cette pathologie.

3.7.3.2. *Janus Kinases/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT)*

Les études sur l'induction de gènes par des interférons ont mené à la découverte de la kinase Janus (JAK) et des transducteurs de signal et activateurs de la transcription (STAT), qui depuis ont été largement décrits comme voie de signalisation commune pour de nombreuses cytokines. En effet, le principal mécanisme par lequel les récepteurs de cytokines traduisent les signaux intracellulaires débute par l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. Les réponses des cytokines sont sous la dépendance de l'activation des récepteurs (JAKs) couplés aux tyrosines kinases cytosoliques, ce qui entraîne très souvent le rapprochement de deux récepteurs de telle sorte qu'ils puissent s'auto-phosphoryler sur leurs tyrosines. Ce phénomène de dimérisation est suivi par une phosphorylation et activation de protéines régulatrices appelées STAT (Li et al., 2012). Ces protéines migrent vers le noyau sous forme de dimères et se lient à leur site de reconnaissance, *cytokine responsive promotor element* (CRPE), stimulant la transcription de gènes (Liu et al., 1998) (Figure 14).

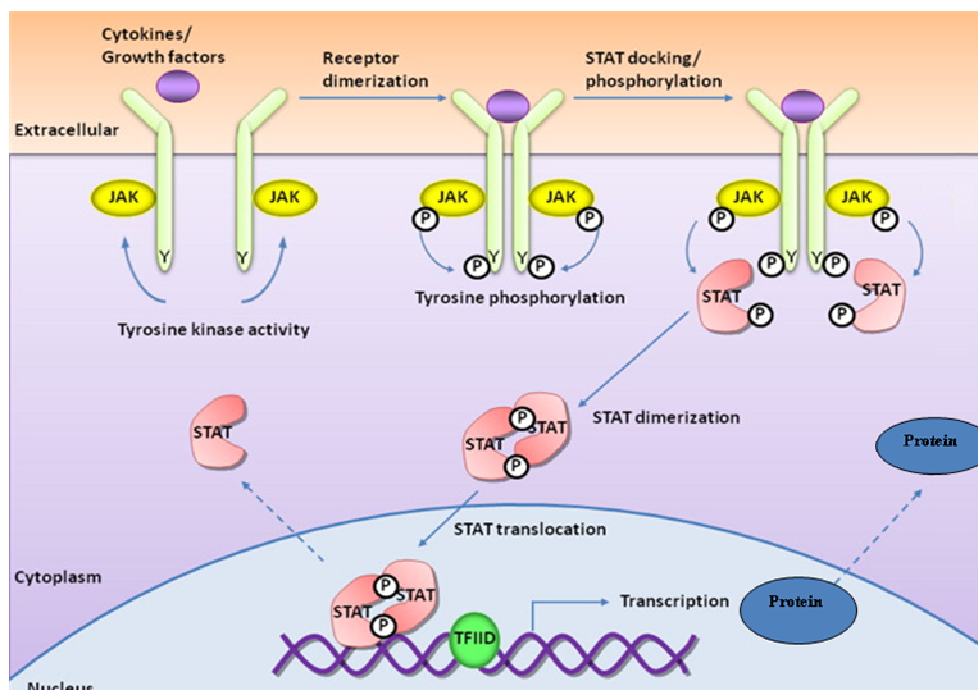


Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT.

(Adapté de Yi Li et al., 2012)

Actuellement, quatre JAK ont été identifiées chez les mammifères, Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 (tyrosine kinase 2), et sept éléments STAT ont été caractérisés, Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5, Stat6 avec deux isoformes de Stat5 appelées Stat5a et Stat5b. Chaque récepteur de cytokine est apparemment couplé à un ensemble spécifique de JAK et STAT, résumé dans le tableau 2.

Ligand	Récepteurs	JAK-Kinase	Stat Family Members
IL-6	IL-6R α	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3
IL-11	IL-11R	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat3
CNTF, CT-1, LIF, OSM	CNTFR, CT-1R, LIFR, OSMR	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat3, Stat1, Stat5
G-CSF	G-CSFR	Jak2, Tyk2	Stat3
IL-12	IL-12R β 1, IL-12R β 2	Jak2, Tyk2	Stat4
Leptine	LeptineR	Jak2	Stat3, Stat5, Stat6
IL-3	IL-3R α + β c	Jak2	Stat3, Stat5, Stat6
IL-5	IL-5R β c	Jak2	Stat3, Stat5, Stat6
GM-CSF	GM-CSFR β c	Jak2	Stat3, Stat5
Angiotensine	GPCR	Jak2, Tyk2	Stat1, Stat2, Stat3
Serotonine	GPCR	Jak2	Stat3
α -Trombine	GPCR	Jak2	Stat1, Stat3
Chemokines	CXCR	Jak2, Jak3	
IL-2	IL-2R α + IL-2R β + γ c	Jak1, Jak2, Jak3	Stat3, Stat5
IL-4	IL-4R α + γ cR	Jak1, Jak3	Stat6
IL-7	IL-7R+ γ c	Jak1, Jak3	Stat3, Stat5
IL-9	IL-9R+ γ c	Jak1, Jak3	Stat1, Stat3, Stat5
IL-13	IL-13R α 1+ IL-4R α	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat6
IL-15	IL-15R α + IL-2R β + γ c	Jak1, Jak3	Stat3, Stat5
IL-19	IL-20R α + IL-20R β	Jak1	Stat3
IL-20	IL-20R α +IL-22, IL-20R β	Jak1	Stat3
IL-21	IL-21R+ γ c	Jak1, Jak3	Stat1, Stat3, Stat5
IL-22	IL-22R+IL10R β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat3, Stat5
IL-23	IL-12R β 1+IL-23R	Jak2, Tyk2	Stat4
IL-24	IL-20R α +IL-22, IL-20R β	Jak1	Stat3
IL-26	IL-20R α +IL-10R β	Jak1, Tyk2	Stat3
IL-27	gp130+WSX1	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat1, Stat2, Stat3 Stat4, Stat5
IL-28A, IL-28B IL-29	IL-28+IL10R β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2, Stat3 Stat4, Stat5
IL-31	IL-31R α +OMR	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3, Stat5
IL-35	gp130+WSX1	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3, Stat5
GH	GHR	Jak2	Stat1, Stat5
TPÖ	TPOR	Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3, Stat5
EPO, Pro	EPOR, ProlactineR	Jak2	Stat5
IFN (α/β)	IFNAR1+ IFNAR2	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5
IFN- γ	IFN γ R1+ IFN γ R2	Jak1, Jak2	Stat1
IL-10	IL-10R α +IL10-R β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat3, Stat5
TLSP	TLRPR et IL-17R	Jak1	Stat3, Stat5
EGF	EGFR	Jak1	Stat1, Stat3, Stat5
PDGF	PDGFR	Jak1, Jak2	Stat1, Stat3, Stat5

Tableau 2: Les récepteurs des cytokines et leurs protéines JAK et STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est impliquée dans différentes fonctions très spécifiques. En effet, plus de trente cytokines et hormones activent cette voie, celles-ci ont un rôle essentiel dans l'immunité innée et acquise, la prolifération, la différenciation et le cycle cellulaire. De plus, la voie JAK/STAT régule la migration et le métabolisme de la cellule. Les récepteurs couplés à JAK/STAT sont regroupés en plusieurs familles en fonction de leur nature multimérique et de leur couplage à une ou plusieurs protéines JAK (Kisseleva et al., 2002).

- *La famille du récepteur de l'hormone de croissance :*

Elle comprend les récepteurs de l'hormone de croissance (GHR), le récepteur de l'érythropoïétine (EPOR), le récepteur de facteurs de croissance des granulocytes (G-CSFR), le récepteur de la thrombopoïétine (TPOR), le récepteur de la prolactine (Prolactine R) et le récepteur de la leptine (leptine R)

- *Les familles de récepteurs d'interleukines :*

Ces familles comprennent les récepteurs des interleukines 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 21, 22, 23.

- *Les récepteurs des interférons:*

Ils correspondent aux trois types d'interférons : les interférons (α/β) du type 1 qui se lient aux récepteurs IFNAR (sous-unité IFNAR1 et IFNAR2) ; les interférons (γ) du type 2 se liant aux récepteurs IFN γ R (sous-unité IFN γ R1 et IFN γ R2) ; les interférons du type 3 (IFN γ 1 ou IL-29, IFN γ 2 ou IL-28A et IFN γ 3 ou IL-28B). Ils se lient aux récepteurs IFNLR composés de sous-unités (IL-28+IL10R β).

Une grande partie des propriétés de JAK/STAT a été démontrée grâce à des études sur des souris knockout. En effet, la délétion du gène responsable de la transcription de *Jak2* aboutit à un phénotype léthal pour l'embryon. Le même phénotype a été aussi observé chez les animaux dont le gène *Stat3* a été supprimé. Ceci permet de démontrer l'importance de cette kinase dans les processus précoces du développement embryonnaire. De même, des souris knockout pour *Jak3* et *Stat5a* ou *Stat5b* présentaient une défense immunitaire déficiente.

Cependant, une activation constitutive de JAK a été remarquée dans un certain nombre de lignées cellulaires dérivées de tumeurs, suggérant que les mécanismes de dérégulation de JAK peuvent contribuer à des altérations de croissance et de transformation cellulaire. En revanche, le mécanisme et le rôle des facteurs STAT dans l'oncogène reste inconnus (Kisseleva et al., 2002).

La signalisation JAK/STAT est aussi importante dans la réponse immunitaire innée liée au LPS. De plus, Stat3 semble être impliquée dans les lésions pulmonaires aiguës induites par le LPS (Severgnini et al., 2004)

La signalisation de JAK/STAT interagit directement ou indirectement dans d'autres voies de signalisation. Effectivement, la voie principale de signalisation est souvent accompagnée de voies annexes permettant l'activation d'autres voies de signalisation y compris les MAP kinases, la Phospholipase C γ , la PI3 kinase ainsi que par SFKs (Src famille de tyrosine protéine kinase), et plus particulièrement de Src. STAT peut également être activée par des récepteurs de facteurs de croissance, en particulier l'EGF (Shuh et al., 2011; Su et al., 2010).

3.7.3.3. *Les “Src Family of protein tyrosine Kinase”*

La famille des tyrosine-Kinases Src comprend au moins huit membres, Src, Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn et Yes. Ces kinases jouent un rôle clé dans la régulation de la transduction du signal, grâce à leurs interactions avec différents récepteurs de surface cellulaire dans plusieurs contextes. Cette régulation implique de nombreux processus comme la croissance, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. Elle agit aussi sur des signaux cellulaires spécifiques. En effet, les Src sont activées suite à la reconnaissance des immuno-récepteurs, des récepteurs de cytokines (JAK/STAT), des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs de PTK (New and Wong, 2007; Thomas and Brugge, 1997). De plus, la famille Src peut être activée par l'irradiation UV et le LPS (Avila et al., 2012; Byun et al., 2012; Kitagawa et al., 2002; Tseng et al., 2012).

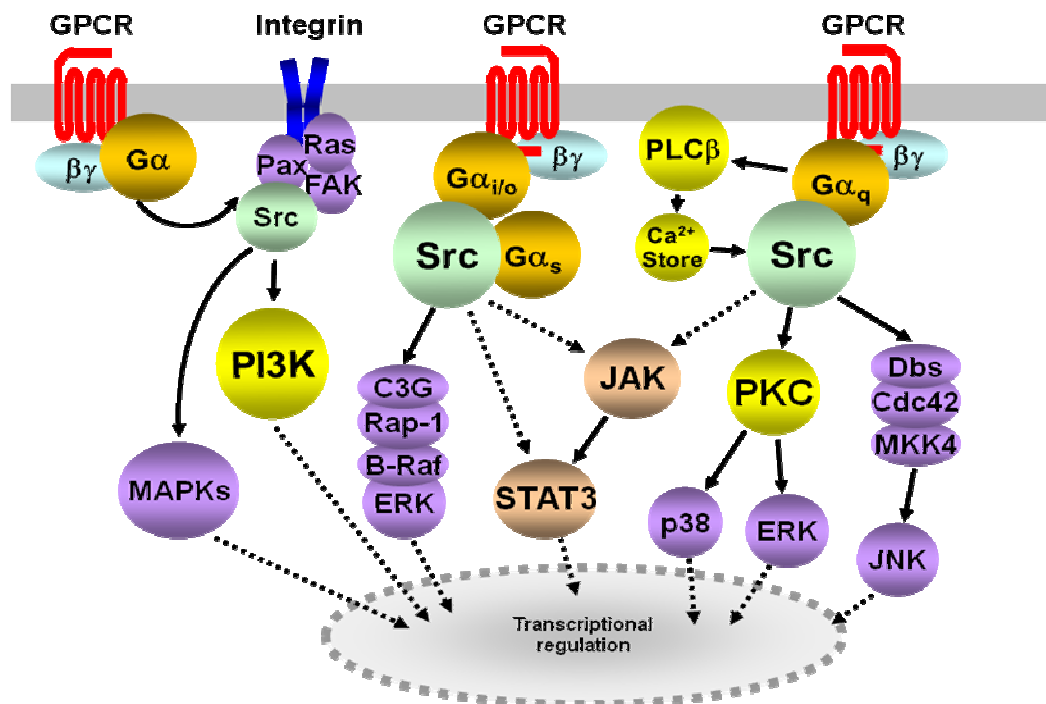


Figure 15 : Signalisation de la famille Src et voies de signalisation associées :
(Adapté de New eand Wong, 2007)

4. Mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la BPCO

La plupart des auteurs ont montré que les processus concourant à la destruction des structures alvéolaires au cours de la BPCO sont une conséquence d'une inflammation chronique qui implique :

- D'une part, la perturbation de l'équilibre entre les enzymes protéolytiques et les antiprotéases dans les poumons, entraînant une augmentation de l'activité protéolytique et provoquant la destruction du parenchyme pulmonaire, conduisant ainsi au développement de l'emphysème.

- D'autre part, le déséquilibre entre les antioxydants et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par la fumée de cigarette ou libérées par les cellules inflammatoires. Ce stress oxydant est responsable d'un dysfonctionnement de la mort cellulaire et de dommages à la matrice extracellulaire des poumons (Barnes, 2003).

4.1. Rôle de la balance protéase-antiprotéase

Le concept qu'un déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase conduisant au développement de l'emphysème est survenu suite à l'observation par Eriksson, d'une corrélation entre la diminution des taux sériques de la α 1-AT et le développement d'un emphysème (Eriksson, 1964). Ce constat a été ensuite appuyé par d'autres travaux qui ont démontré une lésion pulmonaire très proche de l'emphysème humain après l'instillation intra-trachéale d'enzymes protéolytiques chez le rongeur (Gross et al., 1965). Ces résultats ont abouti à la théorie du déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase, qui perdure encore aujourd'hui et est considéré comme la clé de la physiopathologie de la BPCO (Mal et al., 1999). Différentes protéases régulent la destruction des composants de la matrice extracellulaire, en particulier l'élastine, qui produira une perte de l'élasticité du parenchyme pulmonaire

4.1.1. Les protéases

Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent la dégradation des composants des tissus conjonctifs tels que l'élastine, le protéoglycane, la fibronectine et du collagène type I, II, III, IV. L'élastine comprend un pourcentage appréciable de l'ensemble du

contenu protéique dans certains tissus, comme les artères, certains ligaments et les poumons. Chez l'Homme, les protéases sont retrouvées dans le pancréas et dans certaines cellules telles que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les plaquettes, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Il existe quatre classes majeures de protéases : les protéases à serine, les protéases à cystéine, les protéases à acide aspartique et les métalloprotéases. Elles sont classifiées selon leur mécanisme catalytique. Par exemple, les protéases à serines possèdent dans leur site enzymatique, une sérine nécessaire au clivage protéique.

4.1.1.1. Les sérines protéases

Les protéases à serine représentent environ un tiers de protéases totales actuellement identifiées. L'élastase du neutrophile, la cathepsine G et la protéinase 3 sont les sérines protéases principalement impliquées dans la BPCO. Parmi celles-ci, l'élastase du neutrophile joue un rôle prépondérant.

4.1.1.1.1. L'élastase du neutrophile

- *Caractéristique*

Bien que l'activité des protéases leucocytes ait été décrite au début du XX^e siècle, l'élastase du neutrophile (NE) a seulement été identifiée en 1968 par Janoff et Scherer (Janoff and Scherer, 1968). La NE est une glycoprotéine de 218 acides aminés, d'environ 30 kDa avec un caractère fortement basique ($pI \approx 10.5$). Le terme "élastase" est utilisé pour décrire une enzyme capable de produire des peptides solubles à partir de l'élastine insoluble. Cependant, l'élastine ne représente pas leur substrat préférentiel (Owen, 2008). L'élastase du neutrophile est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-protéine inactive contenant un peptide signal et un pro-dipeptide en position N-terminale (Gullberg et al., 1997). Son activation nécessite le clivage du peptide signal par une peptidase dans le réticulum endoplasmique et du dipeptide de la pro-région par la Dipeptidyl peptidase I (Adkison et al., 2002) ainsi que le clivage en C-terminal d'un peptide de 20 résidus. Les NEs actives sont ensuite stockées dans les granules azurophiles dans l'enveloppe nucléaire, jusqu'à ce qu'elles soient libérées après exposition à des facteurs pro-inflammatoires (Clark et al., 1980)

- Fonctions biologiques

La NE est actuellement considérée comme une enzyme multifonctionnelle. Initialement, elle a été reconnue comme une enzyme de dégradation capable de tuer les agents pathogènes et de cliver les composants de la matrice extracellulaire. Cependant, des données récentes lui ont attribué un rôle dans la réponse inflammatoire. Elle intervient dans les processus de chimiotactisme et de migration par clivage des molécules ou agit dans le processus de libération de chimiokines, de cytokines, des facteurs de croissance, et modulent leur activité biologique. Nous allons décrire certaines de ces fonctions dans la réponse inflammatoire ainsi que ses activités antimicrobiennes.

- La défense antimicrobienne

La NE présente un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections des microorganismes. Ce rôle antimicrobien a été notamment mis en évidence chez des souris déficientes pour la NE. Cette déficience empêche la défense de l'hôte contre les infections à *E.coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (Belaouaj et al., 2000; Belaouaj et al., 1998; Hirche et al., 2008). Suite à une infection, les bactéries sont internalisées par les neutrophiles par formation de phagosomes. L'activation des neutrophiles conduit alors à une fusion des granules intracellulaires avec les phagosomes et à la libération de protéases à l'intérieur des phagolysosomes. De cette façon, cette protéase digère les protéines de surface des bactéries, essentielles au maintien de la virulence et à la stabilité de la structure de la bactérie (Pham, 2006).

La NE a également une activité antimicrobienne à l'extérieur des PMN. En effet, la NE est impliquée dans la formation de fibres extracellulaires composées d'ADN. Ces fibres sont appelées NETs (Neutrophil extracellular trap) car elles vont empêcher la propagation, dégrader les facteurs de virulence et éliminer les bactéries. La NE favorise également la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire (Wartha et al., 2007)

- Rôle dans la réponse inflammatoire

La NE est capable de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire comme l'élastine, le collagène (type I-IV), la fibronectine, la laminine et les

protéoglycanes (Ginzberg et al., 2001). De plus, elle cible d'autres molécules biologiques comme les cytokines et chimiokines. Elle peut également activer des récepteurs par clivage (exemple du récepteur du TNF- α ou des récepteurs PAR1) ou en inactiver (récepteurs PAR 2 et 3 par exemple) (Cumashi et al., 2001; Dulon et al., 2003; Suzuki et al., 2009). La NE a la capacité de cliver les précurseurs inactifs des chimiokines et des cytokines en une forme active. Cette propriété protéasique lui permet de recruter des leucocytes sur le site inflammatoire et donc de jouer un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse inflammatoire. Cette protéase a la capacité de cliver CXCR1, le récepteur de CXCL8/IL-8, augmentant ainsi la concentration de cette chimiokine sur le site inflammatoire (Hartl et al., 2007)

La NE peut également activer des récepteurs membranaires cibles comme le TLR4 ou l'EGFR « *epithelial growth factor receptor* » de façon indirecte. En effet, la NE clive une protéase membranaire appelée meprin- α , qui va activer le TLR4 et l'EGFR entraînant l'activation de NF κ -B et des MAP Kinases et la production de CXCL8/IL-8 (Bergin et al., 2008). La NE peut aussi activer l'EGFR par l'intermédiaire d'une autre voie impliquant les ROS entraînant une production de MUC5AC (Shao and Nadel, 2005). Les récepteurs PARs sont aussi des cibles de la NE. La NE peut activer PAR-2 entraînant une action pro ou anti-inflammatoire. Dulon et al., ont montré une inactivation de PAR-2 par la NE (Dulon et al., 2003). La NE entraîne par ailleurs une augmentation de la production de protéases du macrophage comme la cathepsine B et la MMP-2 (Geraghty et al., 2007). De plus cette protéase peut aussi être activée par la MMP-9 et dégrader son inhibiteur endogène, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloprotease 1) (Jackson et al., 2010)

Outre sa fonction d'activateur des récepteurs et cytokines, la NE présente également la capacité de les inactiver les rendant ainsi moins sensibles. En effet, la NE est capable de cliver des cytokines/chimiokines comme le TNF- α , l'IL-2 et l'IL12p40 et de diminuer ainsi leur demi-vie et donc la signalisation qu'elles peuvent induire (Ariel et al., 1998). Curieusement, elle clive aussi l'IL-6 et CXCL8/IL-8, alors que elle induit également leur production (Bank et al., 2000; Witherden et al., 2004).

Le CD4, le CD8, le CD25, le CD40, le CD80 et le CD86 sont également des cibles de l'élastase. La réponse immunitaire adaptative médiée par les cellules dendritiques et les lymphocytes est donc inhibée en présence de la NE (Doring et al., 1995; Roghanian et al., 2006).

Enfin, du fait que cette protéase a la capacité de dégrader la MEC pulmonaire et d'augmenter le nombre de leucocytes dans le LBA, des modèles expérimentaux d'emphysème induit par la NE sont développés (Couillin et al., 2009).

4.1.1.1.2. La protéinase 3 et la Cathepsine G

La protéinase 3 (PR3) et la Cathepsine G (CG) sont de protéases homologues à la NE, les séquences protéiques de ces 3 protéases étant très proches. Et comme la NE, ce sont des protéases à serine contenues dans les granules azurophiles des PMN. La PR3 et la CG possèdent un rôle dans la réponse inflammatoire, notamment dans la dégradation de protéines intracellulaires (dégradation des pathogènes) et extracellulaires comme les protéines de la matrice (l'élastine ou la laminine) (Boudier et al., 1991; Rao et al., 1991).

La PR3 est capable de cliver les PAR-1 entraine son inactivation (Renesto et al., 1997). De plus, la PR3 est capable de cliver la pro-IL- β et le pro-TNF- α pour entrainer leur activation.

La Cathepsine G (CG) est capable de cliver et d'activer les récepteurs PAR-4 (Sambrano et al., 2000) et également de cliver et d'inhiber PAR-1 (Renesto et al., 1997). Les cytokines, telles que l'IL-6 et le TNF- α sont aussi inactivées par la CG (Bank et al., 1999; Scuderi et al., 1991). Le CD14 est également clivé par la CG, agissant ainsi sur la phagocytose (Le-Barillec et al., 2000).

La CG joue aussi un rôle dans la réponse immunitaire adaptative, dans la mesure où elle est capable de diminuer l'expression de CD2, de CD4 et de CD8, qui sont des molécules exprimées par les lymphocytes T (Doring et al., 1995).

4.1.1.2. *Les Métalloprotéase*

Les Métalloprotéase (MMPs) représentent une grande famille de protéases dépendantes du zinc, elles régulent la destruction des composants de la matrice extracellulaire et de ce fait, jouent un rôle dans le remodelage tissulaire et la migration cellulaire.

Cette super famille sont constituées de 25 membres. Celle-ci peut être subdivisée en collagénases (MMP-1, 8, et 13), gélatinases (MMP-2 et 9), stromélysines (MMP-3, 10 et 11), matrilysine (MMP-7), MMP du macrophage (MMP-12), MMP membranaires (MMP-14 à MMP-25) (Srivastava et al., 2007). Les MMPs peuvent être produites par diverses sources cellulaires telles que les cellules inflammatoires, stromales et épithéliales. Elles sont exprimées à des niveaux bas dans les tissus adultes mais leur expression est induite lors des processus de remodelage physiologiques ou pathologiques tels que le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, l'inflammation et la cancérogénèse. Aussi, de nombreuses études ont montré que les MMP peuvent soit favoriser ou inhiber un processus inflammatoire par clivage protéolytique direct de médiateurs de l'inflammation, y compris des chimiokines, des cytokines pour activer, désactiver ou antagoniser leurs fonctions (Churg et al., 2011). De nombreuses études suggèrent une possible implication des MMPs dans la pathogenèse de la BPCO. Parmi toutes, les MMPs, les MMP-2, 9 et 12 jouent un rôle important dans la dégradation progressive des structures alvéolaires, notamment l'élastine et le collagène.

4.1.1.2.1. La métalloprotéase 2

Des quantités accrues de métalloprotéase 2 (MMP-2) ont été mesurées chez des patients atteints de BPCO. Ainsi, certains patients présentent une augmentation d'activité gélatinolytique dans leurs expectorations forcées, liée notamment à la présence de MMP-2 (Cataldo et al., 2000). En outre, Ohnishi et ses collaborateurs ont montré que la quantité de MMP-2 peut être multipliée par plus de 3 dans les poumons, lorsqu'un sujet souffre d'emphysème (Ohnishi et al., 1998). Dans cette étude, la MMP-2 a principalement été localisée au niveau des pneumocytes, des fibroblastes et des macrophages alvéolaires

4.1.1.2.2. Les metalloprotéases 9

Des études ont mis en évidence une augmentation de MMP-9 dans LBA. Cette augmentation est corrélée avec le déclin des fonctions pulmonaires et un afflux de lymphocytes, d'éosinophiles, de macrophages et de neutrophiles, suggérant une implication de la MMP-9 dans le maintien de l'inflammation (Finlay et al., 1997b; Mercer et al., 2005). De plus, Finlay et ses collaborateurs ont montré que les quantités d'ARNm MMP-9 sont plus importantes dans les macrophages de patients atteints d'emphysème que dans ceux de volontaires sains (Finlay et al., 1997a). Des études d'immunohistochimie sur des tissus pulmonaires de patients atteints de la BPCO ont aussi permis de localiser la MMP-9 au niveau des neutrophiles (Segura-Valdez et al., 2000). Ce lien entre les neutrophiles et la production de MMP-9 a également été suggéré dans des modèles murins d'exposition à la fumée de cigarette et au LPS (Corbel et al., 1999; Leclerc et al., 2006). Finalement, la MMP-9 est activée par clivage par la MMP-2, MMP-3, NE ou par clivage oxydatif (Ramos-DeSimone et al., 1999; Zhang et al., 2013).

4.1.1.2.3. Les métalloprotéases 12

L'élastase du macrophage, ou MMP-12, est une pro-enzyme de 54 KDa, identifiée comme une métalloprotéase élastolytique (Banda and Werb, 1981; Werb and Gordon, 1975). Elle peut également être sécrétée par des cellules épithéliales bronchiques en culture (Lavigne et al., 2004) et est exprimée par des cellules musculaires lisses des voies aériennes humaines (Xie et al., 2005).

La MMP-12 joue un rôle prépondérant dans le développement la BPCO. D'une part elle dégrade l'élastine qui représente 2.5 % du poids du poumon et dont les produits de ses dégradations, comme la desmosine, sont présents en grande quantité dans les urines des sujets atteints de la BPCO. De plus, une corrélation positive entre celle-ci et le déclin de la fonction pulmonaire a été démontré. D'autre part, le recrutement des macrophages observé en réponse à la fumée de cigarette pourrait être lié aux propriétés élastolytiques de la MMP-12. En effet, la MMP-12 génère des dérivés peptidiques qui possèdent des propriétés chimiotactiques pour des monocytes (Houghton et al., 2006). Plusieurs études ont montré que la MMP-12 est augmentée dans les expectorations forcées et dans les LBA de patients atteints de BPCO

comparés aux témoins, suggérant une implication de la MMP-12 dans le développement de la BPCO (Babusyte et al., 2007)

La MMP-12 est capable de cliver des protéines non matricielles pour réguler divers processus biologiques. Elle possède la capacité de cliver le TNF- α latent à la surface des cellules pour en libérer la forme active (Gearing et al., 1994). Elle peut également inactiver par clivage protéolytique l' α 1-AT favorisant ainsi l'action de l'élastase du neutrophile (Banda et al., 1988; Banda and Werb, 1981). Il est intéressant de noter que ces deux protéases ont des actions coopératives car l'élastase du neutrophile est capable quant à elle d'inactiver le TIMP-1, favorisant l'activité de la MMP-12 (Itoh and Nagase, 1995). Enfin, une autre fonction importante de la MMP-12 est activée d'autres MMPs comme la MMP-2 et la MMP-3, participant ainsi à l'amplification des processus de cascades protéolytiques (Matsumoto et al., 1998).

Pendant l'activation, les protéases modulent les processus inflammatoires en clivant les composants de la MEC, les cytokines/chimiokines et les récepteurs membranaires (Pham, 2006). Mais l'activité excessive des protéases libérées dans le milieu extracellulaire peut conduire à la dégradation protéolytique du tissu extracellulaire et doit être maintenue sous contrôle. En conditions physiologiques, l'activité protéolytique des protéases est régulée par des inhibiteurs naturels, les antiprotéases présentes sur le site inflammatoire.

4.1.2. *Les anti-protéases*

4.1.2.1. Inhibiteurs de l'activité protéolytique des protéases à serine du Neutrophile

L'activité protéolytique des protéases à serine est étroitement contrôlée par des inhibiteurs endogènes d'origine plasmatique ou tissulaire qui ciblent une ou plusieurs de ces protéases. L'inhibiteur de l' α 1-protéinase (α 1-PI) initialement appelé α 1-Antitrypsine est le principal inhibiteur systémique de l'activité de la NE qui augmente au cours des phases aiguës de l'inflammation et de l'infection (Bergenfelt et al., 1992). Cette antiprotéase est également capable d'inhiber la PR3. Elle est une des principales anti-protéases de l'organisme et fait partie des protéines appelées Serpines pour « Serine protease inhibitors ». Elle est produite par les hépatocytes et les cellules épithéliales pulmonaires et sa fonction principale s'exerce au niveau du parenchyme pulmonaire (Boutten et al., 1998; Sallenave et al., 1997;

Venembre et al., 1994). Chez les sujets présentant un déficit génétique en $\alpha 1$ -PI, le déséquilibre entre cette antiprotéase et protéase peut aboutir à la dégradation de la structure pulmonaire et au développement d'un emphysème (Wood and Stockley, 2007).

Par ailleurs, une étude réalisée par Churg et ses collaborateurs a montré que $\alpha 1$ -PI est également capable d'inhiber la libération de MMP-12 et de TNF- α par des macrophages alvéolaires en culture stimulés par la fumée de cigarette (Churg et al., 2007b). Ces résultats mettent en évidence des aspects anti-inflammatoires de cette anti-protéase.

Durant les infections et lors des libérations accrues de NE, la protection par $\alpha 1$ -PI peut être complétée par une production locale (par les cellules épithéliales et les cellules du système immunitaire) d'inhibiteurs de protéases « alarmes » tels que le SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) et l'élafine (Fitch et al., 2006; Sallenave, 2000). Ces deux anti-protéases ont été isolées pour la première fois dans des expectorations forcées de patients atteints de BPCO. Le SLPI est produit de manière constitutive par les cellules épithéliales pulmonaires (Doumas et al., 2005) buccales (Kretschmar et al., 2011), les kératinocytes (Wingens et al., 1998) mais également par les cellules de l'immunité comme les macrophages (van 't Wout et al.) et les neutrophiles (Sallenave et al., 1997).

En plus de protéger les poumons contre l'action excessive de la NE et de la GC, le SLPI présente également la capacité d'influencer l'activité des monocytes/macrophages en favorisant, par exemple, la réduction de leur production de MMP-1 et MMP-9 (Zhang et al., 1997). Il a été aussi démontré que le SPLI régule l'apoptose des neutrophiles (Persson et al., 2006). Il possède également des propriétés antibactériennes contre les bactéries telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Sallenave, 2002).

L'élafine/ESI (elastase-specific inhibitor) a été identifiée pour la première fois dans des sécrétions bronchiques comme un inhibiteur de la NE (Simpson et al., 1999). Bien que les niveaux de production d'élafine constitutifs soient faibles, des quantités plus importantes sont mesurées après un contact avec l'IL-1, le TNF- α , le LPS et la NE (Reid et al., 1999; Sallenave et al., 1994). En revanche, il semble que les niveaux d'élafine soient diminués chez les patients atteints de pathologies chroniques comme la BPCO (Sallenave, 2000). Connue à l'origine pour ses activités anti-élastase, il semble que l'élafine ait également des fonctions antimicrobiennes, identifiées avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphilococcus aureus* (Williams et al., 2006).

4.1.2.2. Les « Tissue Inhibitor of Métalloprotéase »(TIMPs)

Au sein des tissus, les principaux inhibiteurs spécifiques endogènes des MMPs sont les TIMPs : « Tissue Inhibitor of Métalloprotéase ». Quatre types de TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4) ont été identifiés chez les vertébrés. Le TIMP-1 est reconnu pour réguler l'activité des MMP-9 et MMP-12, alors que la MMP-2 est plus préférentiellement inhibée par le TIMP-2. L'expression du TIMP-1 et du TIMP-3 peut être induite par des facteurs comme les cytokines, alors que le TIMP-2 est constitutivement exprimé. Par ailleurs, les TIMP-1, -2 et -4 sont des protéines solubles sécrétées contrairement au TIMP-3 qui est insoluble et associé à la matrice extracellulaire (MEC).

Il est fortement présumé que le déséquilibre pathologique de ces régulateurs essentiels à l'homéostasie de la MEC (TIMPs et MMPs) pourrait être responsable de la genèse d'un microenvironnement favorisant soit l'accumulation (fibrose), soit une dégradation protéolytique progressive de la MEC (emphysème).

La prévalence des TIMPs par rapport aux MMPs est associée à la fibrose pulmonaire aussi bien chez l'Homme (Selman et al., 2000) que chez l'animal (Madtes et al., 2001). La diminution des quantités de TIMPs, généralement associée à une augmentation des MMPs, tient donc une place importante dans le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases, en partie responsable du développement de la BPCO (Mercer et al., 2005).

4.2. Déséquilibre de la balance oxydant/anti-oxydant

Lorsque des espèces actives de l'oxygène (ROS) sont en excès par rapport aux mécanismes de défense anti-oxydants, il se produit un stress oxydatif. Ce déséquilibre de la balance oxydant/anti-oxydant semble contribuer à la pathogenèse de la BPCO.

Les poumons sont constamment exposés à des agents oxydants d'origine endogène par des réactions métaboliques (respiration mitochondriale ou la phagocytes) ou exogène, tels que l'air des polluants ou la fumée de cigarette. En effet, la fumée du tabac est constituée d'environ 4500 composés, parmi eux des composés oxydants (Pryor and Stone, 1993) et aussi d'autres composants qui activent les cellules des espaces alvéolaires libérant dans le milieu extracellulaire de grandes quantités d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Schaberg et al., 1992). Cette production de ROS a été directement liée à l'initiation de la réponse inflammatoire dans les poumons par l'activation de facteurs de transcription

comme le facteur nucléaire kappa B-(NF-kB), la transduction du signal de la protéine activatrice-1 (AP-1) et l'expression des gènes pro-inflammatoires (Rahman, 2003; Rahman et al., 2002; Tomita et al., 2003). De plus, les ROS sont aussi responsables de l'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides, ce qui contribue à provoquer de lésions pulmonaires (Repine et al., 1997). Les produits de peroxydation lipidique tels que le 8-isoprostane, sont également détectés à de taux élevés dans les condensats d'air exhalé de fumeurs atteints de BPCO en phase d'exacerbation comparés à ceux des non fumeurs (Biernacki et al., 2003). Les ROS peuvent altérer le remodelage de la matrice extracellulaire inactivant les antiprotéases. En effet, Lindholt et collègues ont démontré que les ROS activent la forme latente des MMPs. D'autres travaux ont également montré que les antioxydants diminuent l'expression de MMPs (Chao et al., 2013). L'ensemble de ces travaux suggère un rôle important des ROS dans l'augmentation de l'activité élastolitique des enzymes. Le stress oxydatif peut aussi favoriser l'apoptose des cellules épithéliales et endothéliales, contribuant ainsi au développement de l'emphysème (Haddad, 2004; Tudor et al., 2003).

Pendant l'exacerbation de la BPCO, la capacité antioxydant reste faible pendant plusieurs jours. L'épuisement de la capacité antioxydant pourrait être expliqué en partie par la libération de ROS accrue à partir des neutrophiles du sang périphérique ; ceci est illustré par une corrélation négative entre la libération de l'anion superoxyde par les neutrophiles et la capacité antioxydant du plasma (Rahman and MacNee, 1996).

Le stress oxydatif peut donc exacerber la BPCO à travers différents mécanismes, contribuant ainsi au maintien de l'inflammation (Figure 16).

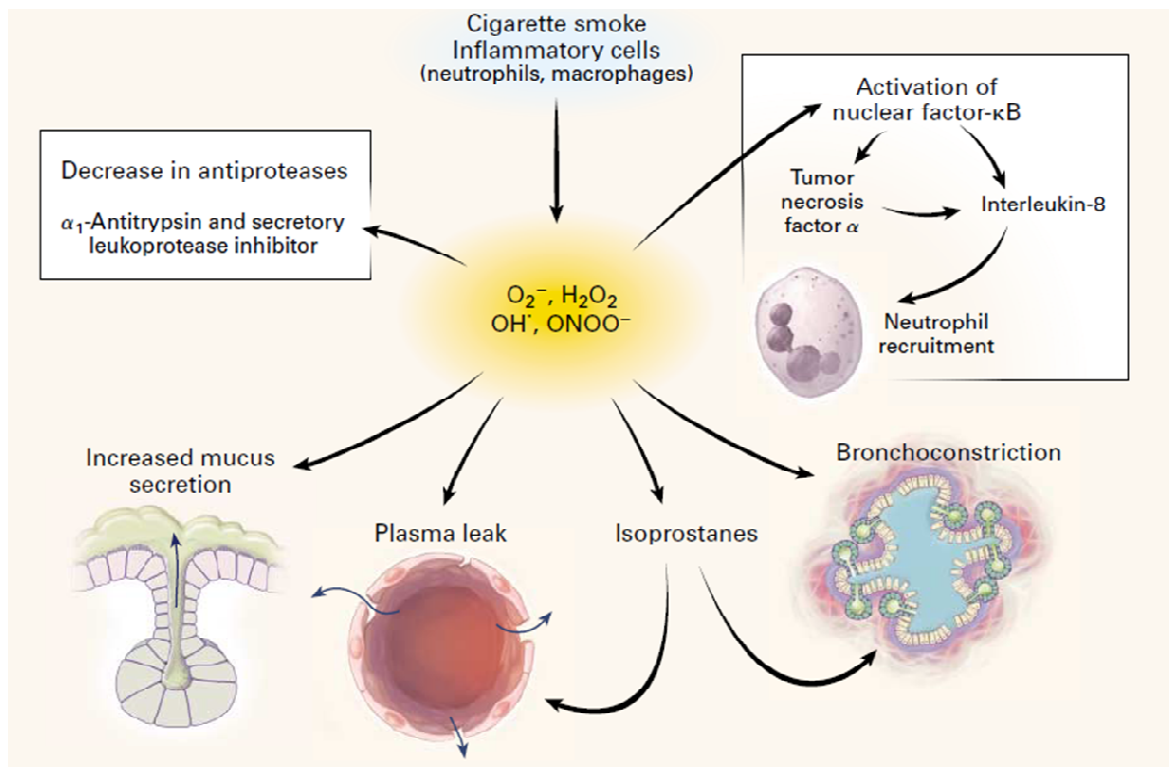


Figure 16 : Implication du stress oxydatif dans la BPCO

(D'après Barnes, 2000)

5. Les traitements contre la BPCO

5.1. Les traitements actuels

Les médicaments prescrits dans les cas de BPCO sont des bronchodilatateurs combinés, en fonction du stade de sévérité de la maladie, à des anti-inflammatoires et à une oxygénothérapie à domicile. Les fluidifiants bronchiques peuvent être également utiles en complément. Les objectifs principaux de la prise en charge des patients sont de diminuer ou de prévenir les symptômes et leurs exacerbations, d'améliorer la qualité de vie et d'augmenter la tolérance à l'exercice physique (GOLD, 2006). Cependant, elle ne permet pas de limiter le déclin de la fonction pulmonaire. Il est donc impératif de proposer de nouveaux traitements pour cette pathologie, d'autant plus que l'arrêt du tabac et/ou l'arrêt de l'exposition toxique qui est la principale mesure susceptible de ralentir le déclin du VEMS d'un sujet atteint de la BPCO reste une condition très difficile à respecter pour un malade.

De nombreux modèles d'études de la BPCO ont permis d'identifier divers mécanismes impliqués dans cette maladie. Depuis, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées. Les principales sont décrites ici (Figure 17).

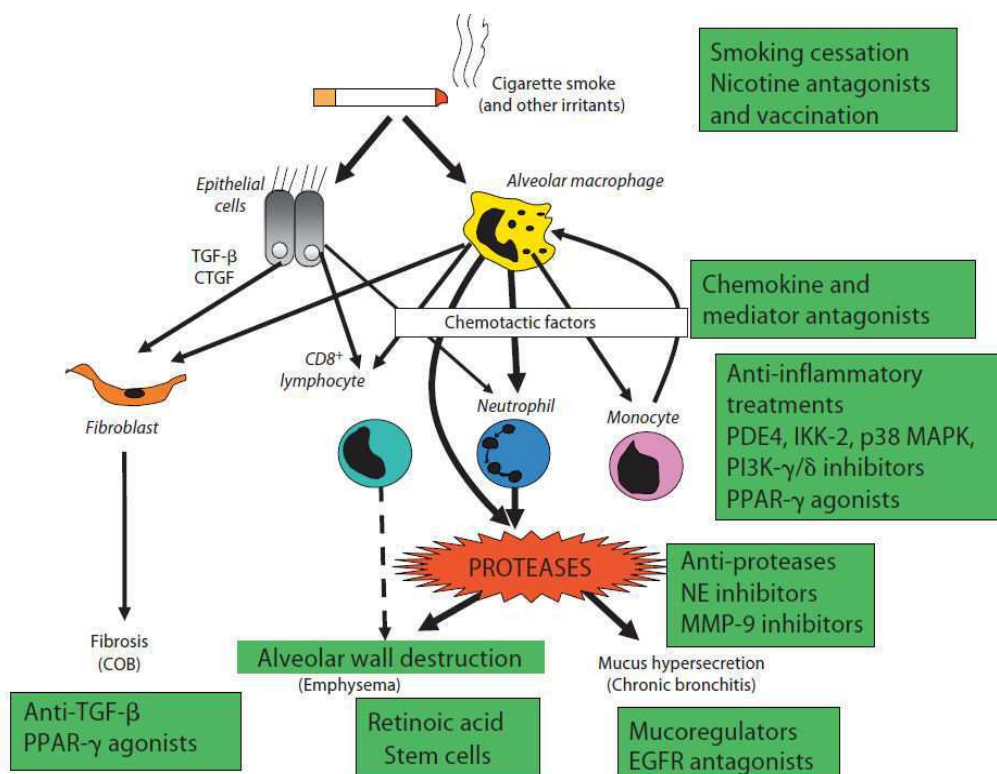


Figure 17: stratégies thérapeutiques contre la BPCO

(D'après Barnes and Stockley, 2005)

5.1.1. *Le sevrage tabagique*

Le tabac est la principale cause de la BPCO. Les bénéfices de l'arrêt du tabac ont été clairement démontrés en termes de mortalité comme de morbidité (O'Donnell et al., 2003). Parce que le tabagisme est un comportement renforcé par une dépendance dont la nicotine est principalement responsable, une aide au sevrage tabagique se montre indispensable. Différents traitements de substitution à la nicotine et certains antidépresseurs sont proposés pour traiter l'état de dépendance (Lancaster et al., 2000). Le bupropion est un antidépresseur atypique. Son mode d'action dans l'aide au sevrage tabagique n'est pas complètement élucidé. Cependant il est efficace pour le sevrage tabagique (Tashkin et al., 2001), et fait l'objet de prescriptions chez les patients motivés. D'autres antidépresseurs ont fait l'objet d'études dans l'aide au sevrage tabagique, mais leur efficacité à long terme reste à déterminer.

5.1.2. *Les bronchodilatateurs*

La dyspnée provoquée par l'obstruction bronchique, peut être partiellement soulagée par l'administration de bronchodilatateurs inhalés. Ceux-ci sont utilisés en traitement de fond ou en appoint pour réduire les symptômes et les exacerbations. Deux classes de bronchodilatateurs ont démontré un intérêt dans la BPCO, d'une part les agonistes β -2 adrénergiques de courte (salbutamol, terbutaline et fenoterol) ou longue (salmétérol, formotérol) durée d'action et d'autre part, les anticholinergiques de courte (ipratropium et oxitropium) ou longue durée d'action (tiotropium). Ils sont utilisés seuls en première intention, cependant, leur association peut apporter un bénéfice symptomatique supplémentaire par rapport à l'administration d'un seul bronchodilatateur. Pour un traitement de fond, à tolérance et efficacité équivalentes, il est préférable d'utiliser un bronchodilatateur à longue durée d'action.

Dans l'optique d'améliorer la prise en charge des patients, plusieurs études se sont tournées vers les nouveaux bronchodilatateurs. Des molécules à action prolongée en inhalation sont aujourd'hui en cours de développement. Plusieurs agonistes β 2 à action prolongée (LABAs, *long acting β 2-receptor agonists*) à inhalation quotidienne, tels que l'indacatérol et carmoterol, sont en développement clinique. L'indacatérol est un dilatateur très efficace des petites voies aériennes avec une action rapide et prolongée pendant plus de 24 h (Sturton et al., 2008).

L'utilisation quotidienne d'un antagoniste muscarinique sélectif du récepteur M3 à action prolongée (LAMAs, *long acting muscarinic receptor antagonists*) tel quel le bromure de tiotropium par inhalation a été une avancée importante dans la thérapie contre la BPCO (Joos et al., 2010). L'association d'agonistes β 2-adrénergiques (formoterol) et d'un antagoniste muscarinique (tiotropium) à action prolongée est actuellement en développement en raison de leurs effets additifs. (van Noord et al., 2006)

5.1.3. Les Corticoïdes

Les signes d'inflammation chronique observés au niveau des voies respiratoires justifient pleinement le fait d'employer des anti-inflammatoires chez les patients atteints de BPCO. Le recours à une corticothérapie inhalée se justifie pour les stades les plus évolués de la BPCO caractérisés par un VEMS inférieur à 50 % (inférieur à 60 % pour l'association salmétérol/fluticasone) et des exacerbations répétées malgré l'utilisation de bronchodilatateurs. Cependant, la résistance aux corticoïdes des patients atteints de BPCO est bien connue aujourd'hui. De plus, même chez les « répondeurs », la réponse d'un patient à l'autre peut être très variable.

Malgré la résistance aux corticoïdes, un effet bénéfique de la corticothérapie systémique dans le traitement des exacerbations aiguës de la BPCO, avec l'amélioration des résultats cliniques et une réduction de la durée d'hospitalisation ont été cités (Gartlehner et al., 2006). Mais, seulement 10% des patients atteints de BPCO montrent une certaine amélioration symptomatique avec les corticostéroïdes administrés par voie orale et il est probable que ces patients soient aussi asthmatiques, les deux maladies concomitantes étant relativement fréquentes. La réponse aux corticostéroïdes est ainsi très souvent associée à deux caractéristiques de l'asthme, à savoir une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les expectorations d'une part, et une augmentation du NO exhalé d'autre part (Keatings and Barnes, 1997). Dans tous les cas, l'inflammation dans la BPCO n'est pas supprimée par un traitement aux corticoïdes, même sous fortes doses (O'Donnell et al., 2003). Les mécanismes moléculaires de résistance aux corticoïdes commencent à être bien décrits. L'inhibition des histones-déacétylases (HDAC) induite par la fumée de cigarette et le stress oxydatif a été démontrée (Barnes, 2004a; Ito et al., 2001; Marwick et al., 2007) ainsi qu'une importante réduction de l'activité et de l'expression de ces HDACs dans le parenchyme pulmonaire de biopsies bronchiques et dans les macrophages alvéolaires des patients atteints de BPCO (Ito et

al., 2005). Chez un sujet sain, un stimulus pro-inflammatoire entraîne une acétylation des histones sous l'influence de l'Histone Acétyl Transférase (HAT), ce qui permet le déroulement de la molécule d'ADN et favorise la transcription de gènes codant pour des protéines inflammatoires (TNF- α , IL-8/CXCL-8...). Un traitement par des corticoïdes permet d'inverser ce phénomène. En se liant à leurs récepteurs spécifiques, les corticoïdes assurent le recrutement de l'histone-déacétylase 2 (HDAC2), qui, en réduisant localement l'activité des HAT, diminue la transcription de gènes pro-inflammatoires. Chez un patient atteint de BPCO, la fumée de cigarette active une réponse inflammatoire, mais dans ce cas, les glucocorticoïdes ne peuvent plus la freiner *via* l'activité HDAC2, car le stress oxydatif diminue son activité (Barnes, 2006)

(Figure 18). La réduction de ce stress oxydatif, par l'administration d'anti-oxydants, semble restaurer la sensibilité aux corticoïdes chez les patients atteints de BPCO (Marwick et al., 2007).

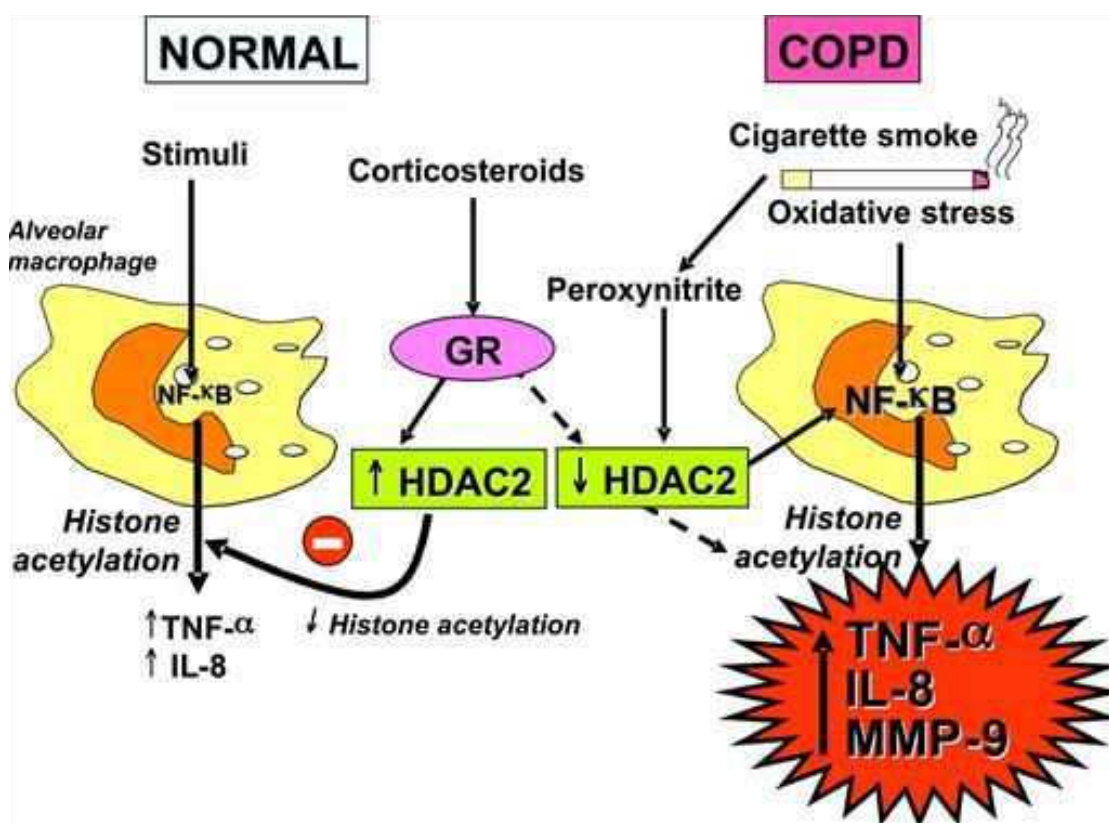


Figure 18: Mécanisme de résistance aux corticoïdes chez un patient atteint de BPCO

Abréviations : GR : Glucocorticoïde Receptor, HDAC2 : Histone Déacétylase 2

(D'après Barnes, 2006)

5.1.4. Les inhibiteurs de la phosphodiesterases

Les phosphodiesterases (PDE) sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) en métabolites inactifs. Depuis la découverte leur activité à la fin des années 1950, de nombreuses isoenzymes ont été décrites. Aujourd'hui, onze familles de phosphodiesterases ont été identifiées, nommées PDE1 à PDE11, ayant des affinités différentes pour l'AMPc ou pour la GMPc.

L'AMPc et la GMPc, seconds messagers importants de par leur rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire, sont devenus des cibles thérapeutiques d'importance dans une grande variété de maladies, dont fait notamment partie la BPCO. L'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc et de GMPc, induite par des inhibiteurs de la PDE (i-PDE), conduit à une relaxation des muscles lisses des voies aériennes et donc à une dilatation des bronches. Des effets anti-inflammatoires d'i-PDE sont aussi décrits.

- Théophylline

La théophylline est un alcaloïde qui, comme son nom l'indique, provient de la feuille de thé. Elle a été largement prescrite dans l'asthme comme bronchodilatateur. Mais ses effets secondaires, cardiaques et centraux, ainsi que des interactions médicamenteuses ont entraîné une large diminution de son utilisation.

La théophylline présente aussi des propriétés anti-inflammatoires, mais son administration seule n'entraîne qu'une légère diminution de l'inflammation. En revanche, cet effet est potentialisé en combinaison à de faibles concentrations de dexaméthasone. Cette association induit la répression de la libération de cytokines inflammatoires dans les macrophages et les cellules épithéliales, contrairement à son utilisation seule qui est inefficace (Ito *et al.*, 2002).

Différents mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer les effets anti-inflammatoires de cette molécule. L'un d'entre eux est sa capacité à activer les Histones Déacétylases (HDAC), responsables de l'inhibition de la transcription de gènes pro-inflammatoires (Ito *et al.*, 2002). La théophylline pourrait ainsi restaurer une sensibilité aux corticoïdes chez des patients atteints de BPCO qui présentent, comme nous l'avons vu précédemment, une activité HDAC faible (Cosio *et al.*, 2004).

Il y a de plus en plus d'études qui mettent en évidence les effets anti-inflammatoires des i-PDE. Kobayashi *et al.*, ont montré une diminution significative de l'élastase du neutrophile chez des patients atteints de BPCO, après un traitement de quatre semaines par de la théophylline (Kobayashi *et al.*, 2004). Une autre étude plus récente suggère un effet de la théophylline sur l'amélioration de la capacité d'exercice chez les patients atteints de BPCO traités en combinaison à un bronchodilatateur à action prolongée (ZuWallack *et al.*, 2001).

- *Inhibiteurs sélectifs de phosphodiesterases-4 (PDE-4)*

La phosphodiesterases de type 4 est une enzyme particulièrement intéressante à cibler pour diminuer l'inflammation pulmonaire dans la BPCO, parce qu'elle constitue la PDE prédominante dans les neutrophiles, les lymphocytes T, les monocytes, qui sont les principales cellules impliquées dans le processus inflammatoire de la BPCO. Elle se trouve également en plus faible quantité dans les macrophages, les cellules musculaires lisses des voies aériennes et les cellules épithéliales (Houslay and Adams, 2003). Les inhibiteurs de PDE4 peuvent donc potentiellement agir pour moduler l'activité de tous ces types cellulaires (Figure 19).

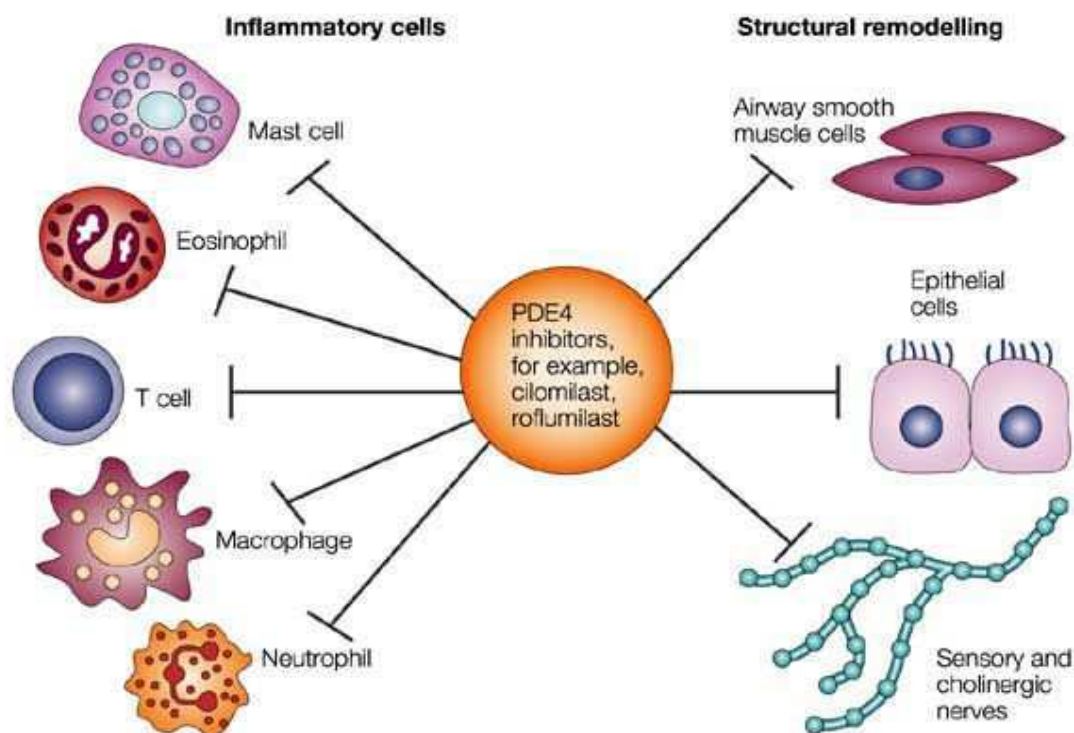


Figure 19 : Cibles potentielles des inhibiteurs de la phosphodiesterases 4

(D'après Barnes *et al.*, 2003)

Cette classe de molécules possède un large spectre anti-inflammatoire tel que l'inhibition du trafic cellulaire et de la libération de cytokines et de chimiokines par les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages et les cellules épithéliales (Cortijo Gimeno and Morcillo Sanchez, 2010; Fan Chung, 2006). L'efficacité d'inhibiteurs sélectifs de PDE4, comme le rolipram, le cilomilast et le roflumilast, a été montrée chez l'animal dans des modèles expérimentaux d'inflammation pulmonaire caractérisée par une infiltration de neutrophiles (Bundschuh et al., 2001; Leclerc et al., 2006; Spond et al., 2001).

Parmi les inhibiteurs de phosphodiesterases, c'est le roflumilast qui a été le plus étudié. Il réduit l'infiltration de cellules inflammatoires pulmonaires (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et cellules B) et l'élargissement de l'espace aérien chez les souris exposées à la fumée de tabac sur une période de 6 mois (Martorana et al., 2005). *In vitro*, il améliore la fréquence des battements ciliaires et préserve le phénotype de la cellule ciliée dans des cultures de cellules épithéliales bronchiques humaines différenciées après exposition à la fumée de cigarette et réduit l'expression de MUC5AC (Mata et al., 2005; Milara et al., 2012). L'action de ce médicament est principalement due à son métabolite : le roflumilast N-oxide.

Ces effets anti-inflammatoires ont également été observés chez des patients souffrant de bronchite chronique, et présentant des phases d'exacerbations fréquentes ou nécessitant l'utilisation répétée de bronchodilatateurs. En effet, le roflumilast améliore la fonction pulmonaire et réduit les exacerbations chez les patients atteints de BPCO sévère (VEMS \leq 50%) (Field, 2011). D'autres études utilisant l'association du roflumilast avec un bronchodilatateur de longue durée d'action (le salmétérol et le tiotropium) ont été très encourageantes. Ils ont permis de conclure que le roflumilast combiné avec le salmétérol ou le tiotropium, contribue à l'amélioration de la fonction pulmonaire (Giembycz and Field, 2010). Ces bénéfices ont permis de proposer le roflumilast comme nouvelle option de traitement par la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) en 2010, en reconnaissant son rôle central dans la diminution de l'inflammation et ses implications cliniques en termes de réduction des exacerbations chez les patients souffrant de BPCO de stades III et IV.

Des études complémentaires montrent que malheureusement, ses effets secondaires tels que la diarrhée, la perte de poids, les nausées et les douleurs abdominales, en limitent l'emploi.

5.2. Vers de nouvelles propositions de traitements

5.2.1. *Les antagonistes de cytokines et chimiokines*

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses cytokines et chimiokines régulent la migration et l'activation de cellules inflammatoires impliquées dans la physiopathologie de la BPCO (Barnes, 2009). Leurs récepteurs représentent donc des cibles thérapeutiques d'intérêt dans la pathologie.

Puisque l'effet chimiotactique de l'IL-8 /CXCL-8, du Gro- α /CXCL1 et de CXCL5 sur les neutrophiles et les monocytes fait intervenir un récepteur commun, le CXCR2, plusieurs antagonistes de ce récepteur sont développés. Il a ainsi été démontré qu'un antagoniste de CXCR1/2 (ADZ8309) est capable d'inhiber l'infiltration de neutrophiles dans le poumon en réponse à l'inhalation d'endotoxines chez la souris (Chapman et al., 2007). Par ailleurs, des études sur des antagonistes de CXCR2 ou avec des anticorps anti-IL-8 montrent une diminution de l'inflammation et des dommages alvéolaires induits par les neutrophiles (Mukaida et al., 1998a; Mukaida et al., 1998b). Mahler et al. (2004) ont également démontré que le traitement par un anticorps monoclonal humain dirigé contre IL-8/CXCL8, l'ABX-IL-8, permet de réduire la sévérité de la dyspnée chez les patients atteints d'une BPCO sévère ou modérée (Mahler et al., 2004).

Un autre récepteur des chimiokines ciblées est le CXCR3, dont les ligands sont le CXCL3, le CXCL9, le CXCL10 et le CXCL11, quatre chimiokines dont le taux est augmenté dans la BPCO (Costa et al., 2008). Les effets des antagonistes de CXCR3 n'ont pas encore été évalués chez des patients atteints de la BPCO, mais sont actuellement en développement.

Le TNF- α semble jouer un rôle central dans la physiopathologie de la BPCO. Aujourd'hui, trois inhibiteurs de ces cytokines sont disponibles (l'étanercept, l'infliximab et l'adalimumab) et trois autres sont en cours de développement (le certizumb, le pegol et le golimumab) (Matera et al., 2009). L'anticorps bloquant, l'infliximab, ne présente pas d'effet significatif sur les symptômes, sur la fonction pulmonaire ou sur la performance physique des patients atteints de BPCO. En revanche, l'étanercept entraîne une réduction des exacerbations, contrairement à l'infliximab, indiquant une éventuelle disparité entre ces différents traitements anti-TNF chez les patients atteints de BPCO (Dentener et al., 2008; Suissa et al., 2008).

5.2.2. *Les inhibiteurs des signaux de transduction*

5.2.2.1. *Les inhibiteurs du facteur nucléaire Kappa B*

Le *facteur de transcription* NF- κ B est séquestré par de kinases (IKK) dans le cytoplasme des cellules non stimulées. L'activation de NF- κ B nécessite la dégradation des IKKs, celui-ci est alors transloqué vers le noyau des cellules (Delhase et al., 2000). Il régule l'expression des chimiokines, des cytokines inflammatoires, des molécules d'adhérence et de certaines MMPs. Le NF- κ B est activé dans les macrophages et les cellules épithéliales de patients BPCO (Cappello et al., 2010). L'utilisation du TCPA-1, qui bloque la dégradation des IKKs, est marquée par une diminution de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- α , IL-1 β , la MMP-9 dans un modèle d'inflammation induite par le LPS (Birrell et al., 2006)

5.2.2.2. *Les inhibiteurs de la Mitogen-activated protein p38*

La MAP (Mitogen-activated protein) kinase p38 régule l'expression de médiateurs inflammatoires tels que le CXCL8/IL-8, le TNF- α et les MMPs. Le rôle potentiel des inhibiteurs de MAPKs dans la BPCO a été démontré dans de nombreux modèles animaux. L'utilisation d'inhibiteurs de p38 peut diminuer la libération de ces médiateurs, et ainsi réduire l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau des poumons chez les souris dans des modèles de BPCO, dans lesquelles les corticostéroïdes sont inefficaces (Smith et al., 2006).

Plusieurs inhibiteurs de la MAPK p38 sont intégrés dans des essais cliniques, mais il apparaît clairement que leur toxicité hépatique limite leur utilisation (Cohen, 2002). Cependant, l'administration de ces médicaments par inhalation pourrait réduire l'exposition systémique.

5.2.2.3. *Les inhibiteurs de phosphoinositides 3 kinase*

Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) sont une famille d'enzymes qui conduisent à la production de seconds messagers lipidiques. En particulier l'isoforme γ de la PI3K a un rôle dans l'activation et le recrutement des monocytes et neutrophiles de sorte que

des inhibiteurs de PI3K- γ pourraient présenter un potentiel anti-inflammatoire (Sasaki et al., 2000). Cependant, la forte implication de la voie de signalisation PI3K/Akt dans la survie cellulaire pourrait représenter un frein quant à l'utilisation de tels inhibiteurs.

5.2.3. *Les activateurs du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes*

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) sont des récepteurs nucléaires appartenant à la famille *des récepteurs aux stéroïdes*. Ils sont activés par des ligands comme les hormones stéroïdes. Plusieurs études montrent que PPAR- α et PPAR- γ peuvent présenter des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Par exemple, des agonistes PPAR- γ tels que le troglitazone inhibent la libération des cytokines par les monocytes et induisent l'apoptose des lymphocytes T, ce qui suggère qu'ils peuvent avoir des effets anti-inflammatoires dans la BPCO (Belvisi et al., 2006). Ils semblent également inhiber la fibrose pulmonaire et donc pouvoir prévenir la progression de la fibrose dans la BPCO (Milam et al., 2008)

5.2.4. *Les Inhibiteurs de protéases*

Le déséquilibre entre les protéases et les antiprotéases joue un rôle important dans la progression de la BPCO. Ainsi, l'inhibition de ces enzymes protéolytiques et/ou l'augmentation de certaines antiprotéases permettraient de freiner la progression de la maladie. De nombreuses études ont donc été réalisées afin de caractériser des molécules à activité anti protéasique telles que des inhibiteurs des protéases à serine, des MMPs et des protéases à cystéine.

5.2.4.1. Les inhibiteurs de l'élastase du neutrophile

De nombreuses sociétés pharmaceutiques se sont intéressées au développement d'inhibiteurs de l'élastase du neutrophile. En effet, l'intervention pharmacologique avec ce type d'inhibiteurs montre une protection significative (approximativement 60% de réduction) contre les effets pro-inflammatoires et emphysémateux d'une exposition chronique à la fumée de cigarette (Wright et al., 2002). Par exemple, l'ONO-6818 et le FR-136706 ont diminué l'élargissement des espaces alvéolaires, la perte d'élasticité et l'hyperinflation pulmonaire

(Ohbayashi, 2002; Tremblay et al., 2003). Mais l'existence d'une toxicité importante a conduit à un arrêt des études. Aujourd'hui, seul le Sivelestat possède une AMM. Celui-ci a été approuvé au Japon pour le traitement des patients ayant une lésion pulmonaire aiguë (ALI) associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique (Hashimoto et al., 2008; Kawabata et al., 1991). Cependant, son utilisation est limitée d'une part, en raison de la toxicité liée à son mécanisme d'action, une interaction irréversible avec l'enzyme cible et d'autre part, par l'administration par perfusion le rendant difficile d'utilisation.

L'AZD9668 est un inhibiteur réversible spécifique de la NE disponible par voie orale. Expérimentalement, il permet une réduction des signes d'inflammation et du nombre de neutrophiles et de macrophages dans les LBA. De même, il empêche la survenue d'emphysème dans un modèle chronique d'exposition à la fumée de la cigarette chez le cobaye (Stevens et al., 2011). Une autre étude plus récente a montré sa capacité à améliorer la fonction pulmonaire chez les patients atteints de bronchectasie (Stockley et al., 2013). Cependant, il a été également testé chez des patients atteints de la BPCO mais ne présente pas d'effet (Gunawardena et al., 2013).

En plus des inhibiteurs synthétiques, l'activité protéolytique de la NE peut être inhibée par l' $\alpha 1$ -PI. Il semble que cet inhibiteur physiologique prévienne le développement de l'emphysème pulmonaire chez le rat et la souris (Petrache et al., 2006). Cependant, le rapport GOLD précise que ce traitement, très coûteux, n'est pas recommandé pour des patients présentant une BPCO non liée à une déficience congénitale en l' $\alpha 1$ -PI (GOLD, 2006).

5.2.4.2. Les inhibiteurs de métalloprotéases

Les MMPs jouent un rôle déterminant dans les altérations tissulaires observées chez les patients atteints de BPCO. Le développement d'inhibiteurs de MMPs représente donc une stratégie thérapeutique prometteuse. Les inhibiteurs naturels, les TIMP, ne conviennent pas pour des applications pharmacologiques en raison de leur trop courte demi-vie *in vivo* (Skiles et al., 2001). De nombreux inhibiteurs de MMPs de synthèse sont aujourd'hui en développement, mais en dépit des efforts considérables déployés par presque toutes les grandes sociétés pharmaceutiques la mise au point d'inhibiteurs de MMP est très difficile (Dorman et al., 2010).

Néan et al. ont montré que le Marimastat, un inhibiteur non spécifique à large spectre, peut empêcher l'afflux de neutrophiles et de macrophages et diminuer les taux de cytokines inflammatoires au niveau des poumons, dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire induite par une instillation de MMP-12, (Nenan et al., 2007). Dans une autre étude, deux inhibiteurs de MMP-12 (RS-113 456 et RS-132 908) se sont montrés efficaces pour prévenir ou bien bloquer le développement de l'emphysème provoqué par la fumée chez la souris (Martin et al., 2001). Par ailleurs, Churg et ses collaborateurs ont présenté l'efficacité d'un inhibiteur mixte MMP-9/MMP-12 (AZ11557272) pour prévenir le développement d'un emphysème pulmonaire chez le cobaye exposé à la fumée de cigarette (Churg et al., 2007a).

6. Modèles d'études de la BPCO

Malgré les progrès de la recherche sur la BPCO, les interrogations sont encore multiples. Afin de faire progresser les connaissances sur cette maladie, de nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* sont développés. Ils permettent également d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules.

6.1. Les modèles *in vitro*

La plupart des modèles développés *in vitro* utilisent les macrophages ou les cellules épithéliales bronchiques ou alvéolaires sous forme de lignées cellulaires ou culture primaire.

Les macrophages sont souvent obtenus à partir des cellules progénitrices CD34 + issues du sang. Il est possible de générer des macrophages en cultivant des monocytes isolés avec un cocktail de cytokines spécifiques. Une alternative consiste en l'utilisation de lignées myéloïdes considérées comme des précurseurs proches des macrophages telles que THP-1, U-937, HL-60, KG-1 et MUTZ-3 (Larsson et al., 2006; Santeagoets et al., 2008).

Parmi les cellules épithéliales, les lignées A549 (pneumocytes de type II), BEAS-2B, Calu-3, 16HBE14o- (épithéliales bronchiques) sont communément utilisées. Ces lignées cellulaires conservent de nombreuses caractéristiques phénotypiques de leur type cellulaire d'origine, mais n'acquièrent pas un phénotype complètement différencié, comme la formation de cils, la sécrétion de mucus, etc. Elles ne peuvent pas représenter fidèlement la situation *in vivo*. Pour pallier ces manques, des modèles de cellules épithéliales primaires obtenues à partir de tissus sont utilisés. Elles peuvent être cultivées sur plastique ou sur des surfaces

revêtues de collagène en monocouche avec un milieu supplémenté en hormones et autres facteurs de croissance. De plus, des modèles de culture cellulaire (primaire ou lignée) en deux ou trois dimensions ou encore en interface air-liquide (ALI) ont été développés.

Des modèles complexes d'interaction entre deux types cellulaires ont été modélisés. Les co-cultures de différents types cellulaires peuvent être réalisées de différentes manières. Elles peuvent être réalisées avec des lignées cellulaires ou des cellules en culture primaires d'origine épithéliale en co-culture avec des lignées cellulaires ou culture primaires de différentes origines comme les cellules endothéliales, les cellules immunitaires et les fibroblastes.

6.1.1. Les modèles cellulaires d'exposition à la fumée de cigarette

La fumée de cigarette est un concentré complexe et dynamique sous forme aérosol, composé de plusieurs milliers de produits chimiques (Rodgman et al., 2000). L'exposition des cellules à la fumée de cigarette fournit un modèle utile pour mimer un contact avec le tabac et en étudier les effets. L'aérosol de fumée est divisé en deux phases: la phase particulaire et la phase gaz/vapeur. La phase particulaire est la fraction minoritaire et constitue 4-9% du poids total de la fumée; la fraction en phase gazeuse est majoritaire et représente 91-96% du poids total (Clunes et al., 2008). Il existe plusieurs méthodes d'exposition à la fumée de cigarette pour des modèles *in vitro* qui peuvent diverger selon les types de «fumée» générée. Les trois méthodes principales permettant d'exposer des cellules à la fumée de cigarette sont la méthode de la fumée particulaire, ou «particulate matter» (PM), l'obtention d'extraits aqueux de fumée, appelé également extrait de fumée de cigarette (CSE) ou encore la génération de fumée directement utilisée dans une chambre d'exposition (Figure 20).

Dans le modèle PM, les particules de fumée sont piégées après passage dans un filtre. Le filtre piège efficacement 99,9% des particules supérieures à 0,1 μm (Johnson et al., 2009). Elles sont ensuite éluées à l'aide de solvant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et diluées dans un milieu de culture qui servira à immerger les cellules. Il s'agit d'une méthode relativement simple et rapide pour l'évaluation biologique de l'exposition à la fumée de cigarette, mais le modèle PM ne contient que 5% de la fumée totale et ne contient pas de composés volatiles (Clunes et al., 2008; Haswell et al., 2010; Johnson et al., 2009). De plus, les solvants utilisés pour extraire les particules des filtres peuvent également influencer le modèle, par exemple le DMSO, qui est un antioxydant connu.

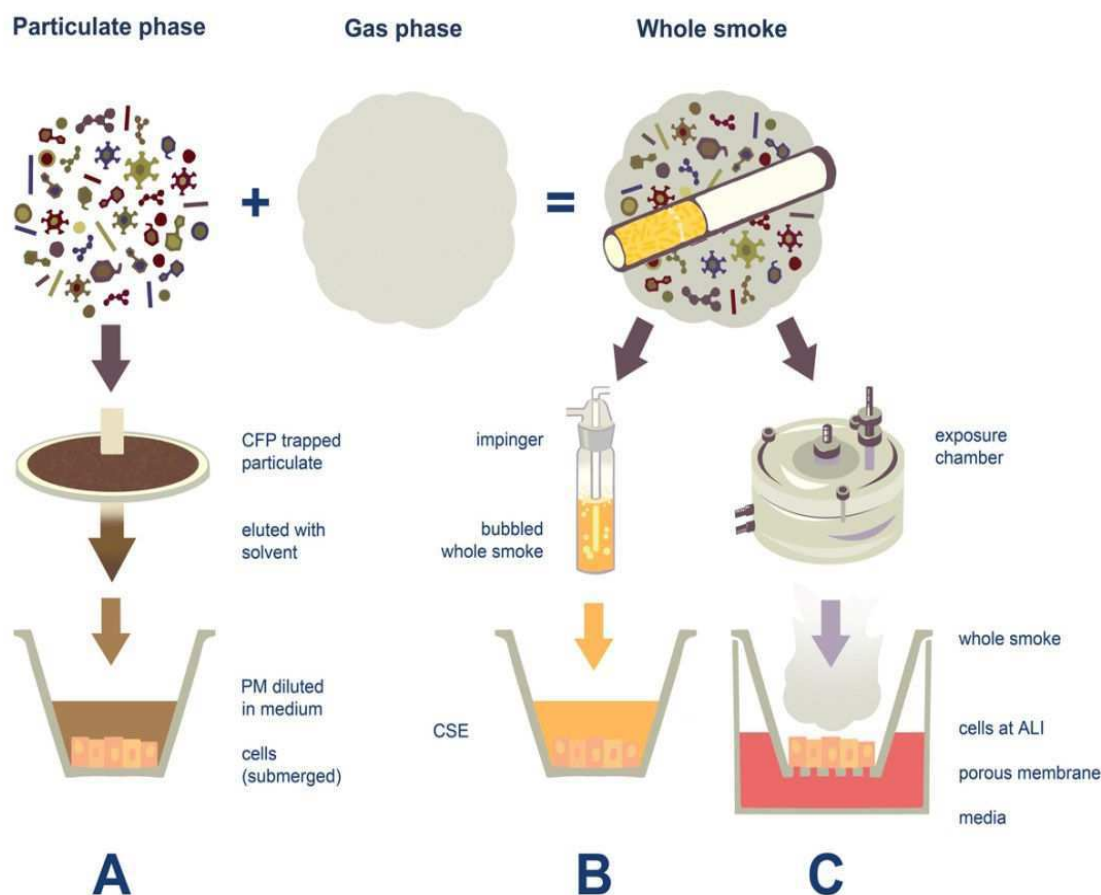


Figure 20 Trois méthodes de production de la fumée pour des tests *in vitro* : (A) les particulaire (PM), (B) des extraits aqueux de fumée de cigarette (CSE) et (C) l'ensemble de la fumée.

(D'après Adamson et al., 2011)

Par ailleurs, l'extrait aqueux de fumée de cigarette (CSE) est obtenu à partir du pompage de la fumée par une pompe péristaltique et instillation dans du milieu de culture cellulaire. Le CSE peut être dilué et ajouté à des cellules dans des conditions de culture submergée. L'avantage de cette méthode est qu'elle capture la phase particulaire et la phase gazeuse de la fumée, même si des incertitudes subsistent quant à sa composition en produits chimiques (St-Laurent et al., 2009). Aujourd'hui, des analyses sur la composition de CSE recueillie sont effectuées et le plus souvent, le CSE est standardisé par une mesure de son absorbance. Cependant, ce type d'exposition manque de pertinence physiologique en comparaison au poumon humain car les cellules sont submergées dans le milieu de culture. En réponse aux limites de ces derniers modèles *in vitro*, des chambres en interface air-liquide sont spécialement développées (Mauders et al., 2007; Phillips et al., 2005). Dans ce modèle, les *apex* des cellules peuvent être exposés à tous les composants de la fumée. Dans cette

méthode, les cellules ou les tissus sont exposés à la fumée et cultivés sur une membrane poreuse submergée par du milieu de culture cellulaire. Ce modèle se rapproche des conditions *in vivo* et permet d'avoir une exposition plus pertinente.

6.1.2. Les modèles cellulaires d'exposition aux élastases

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les élastases, qu'elles soient issues des macrophages ou des neutrophiles, jouent un rôle prépondérant dans les composantes inflammatoire et emphysémateuse de la BPCO. Plusieurs études ont montré que l'élastase des neutrophiles induit la production d'IL-8/CXCL8 et de mucines par les cellules épithéliales (Fischer and Voynow, 2000; Nakamura et al., 1992). L'élastase des neutrophiles a également été décrite comme pouvant favoriser une diminution des battements ciliaires, et surtout, affecter l'intégrité de l'épithélium (Amitani et al., 1991), ce qui peut se traduire en culture cellulaire par un détachement des cellules (Van Wetering et al., 1997).

Des données récentes d'études *in vitro* suggèrent que les cellules épithéliales bronchiques et les cellules musculaires lisses secrètent de la MMP-12 (Lavigne et al., 2004; Le Quement et al., 2008; Luo et al., 2006), ce qui en fait un modèle d'étude pertinent.

6.2. Les modèles *in vivo*

Les modèles animaux permettent de faire le lien entre les études *in vitro* et les études chez l'Homme, et de ce fait, jouent un rôle majeur dans la recherche médicale. Il faut cependant bien garder en mémoire les différences anatomiques et physiologiques entre les animaux et l'Homme avant toute extrapolation de résultats.

Concernant la BPCO, les modèles animaux ont principalement apporté des informations sur les mécanismes mis en jeu lors des phénomènes d'inflammation et d'emphysème pulmonaires.

6.2.1. Les modèles *in vivo* d'exposition au LPS

Divers irritants et molécules chimiques ont été utilisés pour reproduire les symptômes de la BPCO chez l'animal. Les administrations de LPS, notamment réalisées par aérosol ou par voies intranasale et intratrachéale, sont des modèles fréquemment utilisés

(Brusselle et al., 2006). En effet, des molécules bio-actives de LPS sont détectées dans la fumée de cigarette (0.1-0.2 µg/cigarette) (Hasday et al., 1999) et l'instillation de l'endotoxine dans les poumons des animaux provoque une inflammation pulmonaire caractérisée par un afflux de neutrophiles, ainsi qu'une augmentation des niveaux de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , keratinocyte-derived cytokine (KC), MIP-2, IL-8 (Jagiello et al., 1996). Le LPS semble donc être un agent approprié pour induire une BPCO chez l'animal. Il existe différents modèles *in vivo* d'exposition au LPS, les modèles aigus avec une exposition unique entraînant un recrutement rapide des neutrophiles, et les modèles chroniques avec des expositions répétées pendant plusieurs semaines provoquant une accumulation de macrophages et de lymphocytes accompagnée d'un élargissement irréversible des espaces aériens distaux (Vernooy et al., 2002).

Cependant, il semble que les mécanismes à l'origine de l'inflammation induite par le LPS divergent de ceux induits par une exposition à la fumée de cigarette, bien que les marqueurs de l'inflammation soient similaires (Leclerc et al., 2006).

6.2.2. Les modèles *in vivo* d'exposition aux protéases

Depuis les premières expériences réalisées par Gross et ses collaborateurs (Gross et al., 1965), où la papaïne a été instillée directement dans les poumons de rats entraînant des lésions emphysemateuses, beaucoup de recherches sur l'emphysème se sont basées sur l'instillation de protéases dans les poumons de divers animaux. L'administration d'élastase pancréatique porcine (EPP) génère un important élargissement des espaces aériens chez les rongeurs, cobayes, chiens et primates (Kuhn et al., 1976; Snider et al., 1986; Valentine et al., 1983). Cette rapide dégradation du tissu pulmonaire est suivie d'une accumulation de neutrophiles puis de macrophages dans les poumons. Cependant, l'élastase pancréatique semble mieux induire l'emphysème que l'élastase des neutrophiles (Janoff et al., 1977; Senior et al., 1977).

L'emphysème induit par une élastase reste un modèle utile d'emphysème puisqu'il est relativement simple à réaliser, et reproduit beaucoup des aspects de la pathologie humaine. Cependant, il présente trois limites majeures : il ne peut pas être utilisé pour étudier des événements précoces du développement de la BPCO, il ne donne pas d'information au sujet des protéases impliquées dans la pathogenèse de l'emphysème, et enfin, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus à l'Homme, la pathologie humaine étant chronique et de

progression lente (Brusselle et al., 2006). Mais, l'avantage de ce modèle d'inflammation est sa résistance au traitement par des corticoïdes.

6.2.3. *Les Modèles in vivo d'exposition à la fumée de cigarette*

L'exposition de différents animaux, comme les cobayes, souris, rats, hamsters et lapins, à la fumée de cigarette induit une inflammation pulmonaire différente entre les espèces. Les cobayes représentent probablement l'espèce animale la plus sensible, développant un élargissement des espaces aériens après seulement quelques semaines d'exposition. Pour les souris, leur sensibilité apparaît comme étant dépendante de la souche utilisée (Guerassimov et al., 2004). Enfin, les rats semblent être plus résistants au développement d'un emphysème que les souris (March et al., 1999).

Il existe différents types de protocoles d'exposition à la fumée de cigarette, avec des régimes d'exposition unique, multiple (quelques jours voire quelques heures) ou chronique (plusieurs semaines ou mois). La comparaison des résultats obtenus par plusieurs équipes n'est donc pas toujours aisée, du fait des différences qui existent entre les protocoles, les doses, les types de cigarette et les espèces animales utilisées.

Chez la souris, l'exposition aiguë à la fumée de cigarette entraîne une augmentation du nombre des cellules inflammatoires, des cytokines et des produits de dégradation de la MEC dans les poumons et les LBAs (Churg et al., 2002). L'exposition chronique fournit le modèle le plus représentatif de la BPCO, car il conduit à la formation de lésions emphysémateuses associées à un accroissement du nombre de macrophages dans le tissu pulmonaire (Hautamaki et al., 1997). Cependant, ces modèles correspondent approximativement au stade II de sévérité de la classification GOLD chez l'Homme. Aucun d'eux ne permet de reproduire la progression de la maladie après l'arrêt du tabac, telle qu'elle est observée chez l'Homme dans les stades III et IV. Il n'existe pas non plus de modèle de bronchite chronique chez l'animal, ni de modèle permettant de mesurer les épisodes d'exacerbations aiguës (Churg and Wright, 2007).

OBJECTIFS

II- OBJECTIFS

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie caractérisée par une réaction inflammatoire intense avec une destruction du parenchyme pulmonaire et une perte d'élasticité du poumon, conduisant à une obstruction quasi-irréversible des voies aériennes. Le principal facteur de risque de cette maladie est le tabac. Les mécanismes mis en jeu passent par l'activation des cellules épithéliales et des macrophages résidents qui en réponse libèrent des protéases, des radicaux libres de l'oxygène et des médiateurs inflammatoires, y compris des cytokines et des chimiokines. Il en résulte une infiltration de cellules inflammatoires dans le poumon telles que les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules peuvent libérer à leur tour des protéases qui entraînent une destruction de la matrice extracellulaire et des dommages tissulaires. De plus, de fortes évidences montrent que la colonisation de l'arbre trachéobronchique, principalement par des bactéries Gram-négatives, contribue à ce processus inflammatoire et à l'aggravation progressive de la BPCO (Patel et al., 2002; Zalacain et al., 1999).

Nous nous sommes intéressés aux événements précoces du développement de la BPCO associés à une infection bactérienne récurrente. Notre étude s'est focalisée sur des cellules épithéliales alvéolaires car l'épithélium des voies aériennes représente la première ligne de défense contre tous les toxiques inhalés. Nous avons choisi une lignée de pneumocytes de type II (A549) car ce type cellulaire constitue 60% de l'épithélium alvéolaire. De plus, ces cellules sont une source importante de cytokines, telles que la MCP-1/CCL2, Gro- α /CXCL1, TNF- α et IL-8/CXCL8 (Traves et al., 2002).

Dans un premier temps, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de stimulation de cellules épithéliales alvéolaires par la fumée de cigarette associée à de faibles concentrations de LPS. Nous avons mesuré la libération des cytokines induite par la fumée de cigarette seule ou associée au LPS et pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'effet de la fumée de cigarette associée au LPS sur les cellules épithéliales, nous avons évalué l'implication de différentes voies de signalisation. Nous avons mis en évidence une nouvelle voie de signalisation au travers de laquelle la fumée de cigarette associée au LPS peut induire la production de cytokines par les cellules A549. Enfin, les effets anti-inflammatoires de l'inhibiteur sélectif de la PD4, le roflumilast N-oxide, recommandé dans les cas d'exacerbations de la BPCO, ont été évalués dans ce modèle.

Cette première partie a donné lieu à un article actuellement en révision à PLOS ONE: “*Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells*”.

Nous avons aussi utilisé ce modèle sur d’autres types cellulaires (macrophages et cellules épithéliales bronchiques).

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux effets de l’élastase du neutrophile, qui est particulièrement impliquée dans la destruction de la matrix extracellulaire après exposition à la fumée de cigarette. Nous avons mesuré les effets anti-inflammatoires du roflumilast N-oxide sur un modèle *in vitro* de stimulation de cellules épithéliales alvéolaires par l’élastase du neutrophile. Nous avons également évalué l’expression et la libération des cytokines induites par la NE ainsi que les voies de signalisation impliquées. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux cytokines et aux voies de signalisations qui pourraient être diminuées par le roflumilast N-oxide. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d’un article dans le Chapitre 2.

Résulta

Chapitre 1

Évaluation des effets de l'exposition
de différents types cellulaires
pulmonaires à la fumée de cigarette
seule ou associée au LPS

1. Contexte scientifique du travail

Comme nous l'avons vu auparavant, la BPCO est en grande partie provoquée par une exposition à la fumée de cigarette, mais l'aggravation de cette pathologie pulmonaire est également liée à une récurrence des infections, surtout d'origine bactérienne (Sethi et al., 2006; Sethi and Murphy 2008). Dans ce contexte, ce travail a eu comme objectif de mieux comprendre les événements précoces du développement de la BPCO associés à des infections bactériennes. De ce fait, nous avons étudié les effets combinés du CSE et du LPS sur différents types cellulaires pulmonaires.

Nous avons choisi le modèle de « Cigarette Smoke Extract » qui permet la capture de la phase particulaire et de la phase gazeuse de la fumée de cigarette. De plus, ce modèle est bien décrit dans la littérature comme correspondant à une exposition approximative d'un à deux paquets de cigarettes par jour (Milara et al., 2012).

Tout d'abord nous avons déterminé la concentration de CSE à utiliser. Nous avons exposé une lignée de cellules épithéliales alvéolaires (A549) à différentes concentrations de CSE (0,4-10%). Ensuite, afin de déterminer la concentration de LPS nécessaire pour obtenir une activation de cellules en association avec le CSE, nous avons stimulé les mêmes cellules épithéliales avec différentes concentrations de LPS d'*E. coli*. Enfin, nous avons combiné le CSE au le LPS et mesuré la libération des différentes chimiokines. Nous avons opté pour la mesure de trois chimiokines pro-inflammatoires, l'IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 et MCP-1/CCL2 car celles-ci présentent des propriétés chimiotactiques envers les neutrophiles et les macrophages.

Dans un dernier temps, nous avons exploré les voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la production des ces chimiokines et nous nous sommes particulièrement intéressés aux voies des MAP kinases. Enfin, nous avons étudié l'action anti-inflammatoire du roflumilast N-oxide, un inhibiteur de la PDE4, dans ce modèle d'inflammation induite par le CSE associée au LPS. Bien que ce médicament ait déjà fait l'objet d'études sur des modèles *in vivo* et *in vitro*, ses effets sur les voies de signalisation restent encore obscurs. En parallèle, nous avons étudié l'effet de deux autres anti-inflammatoires, la dexaméthasone et la budesonide sur la libération de l'IL-8/CXCL8.

2. Résumé des principaux résultats

La stimulation des cellules A549 pendant 24 heures par du CSE aux concentrations de 0,4% à 10% ne permet pas d'augmenter la quantité d'IL-8/CXCL8 et de Gro- α /CXCL1 libérée (Publication 1 Figure 1A et B). En revanche, la libération de MCP-1/CCL2 a été significativement augmentée pour toutes les concentrations de CSE étudiées (Publication 1 Figure 1D). Cependant, la stimulation par du CSE 2% ou 4% combiné au LPS 0,1 μ g/ml pendant 24 heures permet d'observer une augmentation significative d'IL-8/CXCL8 et de Gro- α /CXCL1 en comparaison au témoin et au LPS seul. De plus, un effet additif sur la libération de MCP-1/CCL2 (Publication 1 Figure 2A-C) est mesuré en comparaison au LPS seul. En revanche, la production de ces chimiokines ne semble pas intervenir dans la transcription des gènes, puisque l'expression des ARNm n'est pas modifiée après 4 heures de traitement (Publication 1 Figure 2D-F).

Une fois notre modèle établi, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation pouvant être impliquées dans l'activation des cellules épithéliales par du CSE en combinaison avec du LPS. Tout d'abord, nous avons ciblé la voie de signalisation des MAP Kinases. La stimulation des A549 par du CSE/LPS induit une activation rapide et transitoire des MAP kinases ERK1/ERK2 après 5 et 15 minutes, suivie d'une phosphorylation plus tardive après 60 minutes de traitement. En revanche, aucune activation des kinases P38 et JNK n'a été détectée dans les mêmes conditions expérimentales (Publication 1 Figure 3 A-C). De plus, un traitement préalable des cellules épithéliales par des inhibiteurs de la kinase MEK (U0126) permet de réduire la libération d'IL-8/CXCL8 et Gro- α /CXCL1, mais pas de la MCP-1/CCL2 (Publication 1 Figure 4 B, E et F). Comme attendu, les inhibiteurs des P38 (203580) et JNK (SP600125) n'affectent pas la libération de ces chimiokines, à l'exception de l'inhibiteur de JNK à 4 μ M, sur la libération de l'IL-8/CXCL8 (Publication 1 Figure 4 A-I).

Une analyse protéomique a pu mettre en évidence que 13 kinases ont été augmentées après une exposition de 40 minutes au CSE+ LPS 0,1 μ g/ml et 7 d'entre elles sont impliquées dans la voie JAK/STAT. En revanche, seulement 6 phosphokinases sont augmentées avec le CSE 4% et 9 avec le LPS 0,1 μ g/ml. Il est important de souligner que l'intensité d'expression après exposition au CSE ou au LPS 0,1 μ g/ml est largement inférieure à l'expression observée après exposition CSE/LPS 0,1 μ g/ml.

Enfin, nous avons étudié les effets d'un inhibiteur de la phosphodiesterase 4, le roflumilast N-oxide, sur la libération des cytokines et sur l'activation de kinases. Le

prétraitement des cellules avec le roflumilast N-oxide associé à PGE2 permet de réduire la libération de chimiokines induites par du CSE/LPS 0,1 µg/ml (Publication 1 Figure 7) ainsi que les voies ERK1/2 et JAK/STAT (Publication 1 Figure 8).

3. Conclusion

En conclusion, notre étude a démontré que le CSE/LPS est capable de stimuler les cellules A549 en leur permettant de libérer des cytokines impliquées dans les processus inflammatoires de la BPCO et d'activer les voies JAK/STAT et ERK 1/2. Ce modèle *in vitro* permet d'émettre des hypothèses sur les conditions d'activation des cellules épithéliales des voies aériennes dans un contexte d'exacerbation de la BPCO. Un effet additif sur la libération de cytokines pourrait être responsable de la progression et l'exacerbation de cette maladie. De plus, nous avons montré qu'une nouvelle voie de signalisation pouvait être activée par la fumée de cigarette associée au LPS et aussi induire la synthèse de cytokines par les cellules A549. Enfin, le roflumilast N-oxide empêche la sécrétion de cytokines, inactivant ainsi les voies JAK/STAT et ERK1/2.

4. Résultats supplémentaires

Après les études menés sur la libération de cytokines et sur l'activation de MAP kinases induite par du CSE/LPS, par les cellules épithéliales alvéolaires (A549), nous nous sommes intéressés à des récepteurs pouvant être impliqués dans ces mécanismes, notamment le TLR4. En parallèle du roflumilast N-oxide, les effets de la dexaméthasone et du budesonide sur la libération d'IL-8/CXCL8 ont été analysés. Nous avons également observé la libération de cytokines par des monocytes issus du sang de donneurs sains différenciés en macrophages et par des cellules épithéliales bronchiques issues d'un patient atteint de la BPCO, après stimulation par du CSE seul ou associé au LPS.

Choix du modèle

Afin de mettre en place un modèle *in vitro* de stimulation de cellules épithéliales alvéolaires par la fumée de cigarette associée à de faibles concentrations de LPS, nous avons tout d'abord observé la libération d'IL-8/CXCL8 par les cellules épithéliales en réponse à différentes concentrations de LPS d'*E. coli*. Nous avons choisi l'IL-8/CXCL8 car la libération de cette chimiokine par les cellules épithéliales alvéolaires (A549) a bien été décrite dans la littérature. Comme attendu, la stimulation des cellules A549 avec le LPS, à des concentrations supérieures ou égales à 0,5 µg/ml, augmente la libération d'IL-8/CXCL8. En revanche, les concentrations de 0,01 et 0,1 µg/ml de LPS n'augmentent pas significativement la quantité d'IL-8/CXCL8 libérée (Publication 1 Figure 1D). Ensuite, nous nous sommes tournés vers l'extrait de la fumée de cigarette. Nous avons testé différentes concentrations de CSE (0.4%-10%), mais aucune n'a été capable d'augmenter la libération d'IL-8/CXCL8 (Publication Figure 1A). Cependant, la stimulation combinée du LPS à 0,1 et 0,01 µg/ml avec les différentes concentrations de CSE pendant 24 heures, permet une augmentation significative de la quantité d'IL-8/CXCL8 d'un facteur deux par le LPS 0,01 µg/ml et trois par le LPS 0,1 µg/ml (Figure 21 B et C). En revanche avec des concentrations supérieures à 0.5 µg/ml de LPS nous n'avons plus l'effet synergique de l'association du CSE au LPS (Figure 21D). La concentration de 0,1 µg/ml de LPS a été donc sélectionnée pour stimuler les cellules en association avec l'extrait de cigarette, car elle n'induit pas de modification de la sécrétion d'IL-8/CXCL8 et nous permet de voir l'effet en combinaison avec le CSE. Pour la suite de notre étude, nous avons fixé la concentration de CSE à 2% et 4% associée au LPS à 0,1 µg/ml.

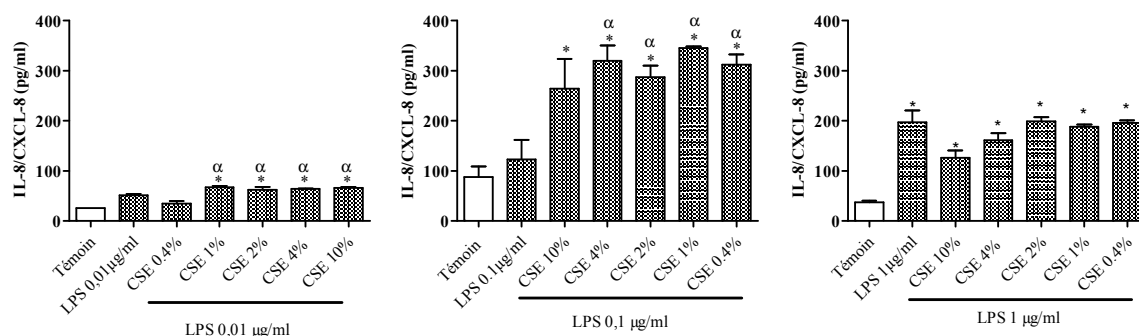


Figure 21: Effet de l'extrait de fumée de cigarette CSE associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8, par les cellules A549. Les cellules A549 sont incubées avec du milieu seul (Témoin), du LPS à 0,01 µg/ml (A), du LPS à 0,1 µg/ml (B) et du LPS à 1 µg/ml (C) seul ou associés à différentes concentrations de CSE pendant 24 h. Les surnageants de culture sont collectés et les concentrations d'IL-8/CXCL8 sont mesurées par ELISA. Les données représentent la moyenne ± SEM de 3 expériences. *P<0,05 en comparaison avec le témoin, ^αP<0,05 en comparaison avec le LPS seul.

Implication du TLR4

Le TLR4 est impliqué dans la réponse immune et dans l'inflammation. Dans ce contexte, il nous importait de savoir si ce type de récepteur jouait un rôle dans la libération de chimiokines par les cellules épithéliales induites par le CSE/LPS. Pour cela, nous avons vérifié que les cellules A549 expriment le TLR4 et si cette expression est modifiée par le CSE seul ou en association au LPS (Figure 22 H). Comme attendu, les cellules A549 expriment le TLR4 mais son expression n'est pas modifiée par la présence de CSE ou de LPS, seul ou en combinaison. L'activation de ces récepteurs peut induire la synthèse de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8/CXCL-8. Pour confirmer l'implication du TLR4 dans la libération de cytokines dans notre modèle, nous avons prétraité les cellules avec un antagoniste du TLR-4. Dans un premier temps, nous avons évalué les effets de différentes concentrations de cet antagoniste sur la libération d'IL-8/CXCL8 induite par LPS 0,5 µg/ml. La présence d'antagoniste diminue de façon dose dépendante la libération d'IL-8/CXCL8 (Figure 22 G) induite par le LPS 0,5µg/ml. De plus, l'antagoniste du TLR4 aux concentrations de 100 ng/ml et 1000 ng/ml inhibe fortement la libération d'IL-8/CXCL8 induite par du CSE/LPS (figure 22 A et B). En revanche, il n'empêche pas la libération de MCP-1/CCL2 et Gro-α/CXCL1 induite par du CSE/LPS (Figure 22 C-F). Ces résultats confirment une libération d'IL-8/CXCL8 dépendante de TLR-4, contrairement à MCP-1/CCL2 ainsi que Gro-α/CXCL1.

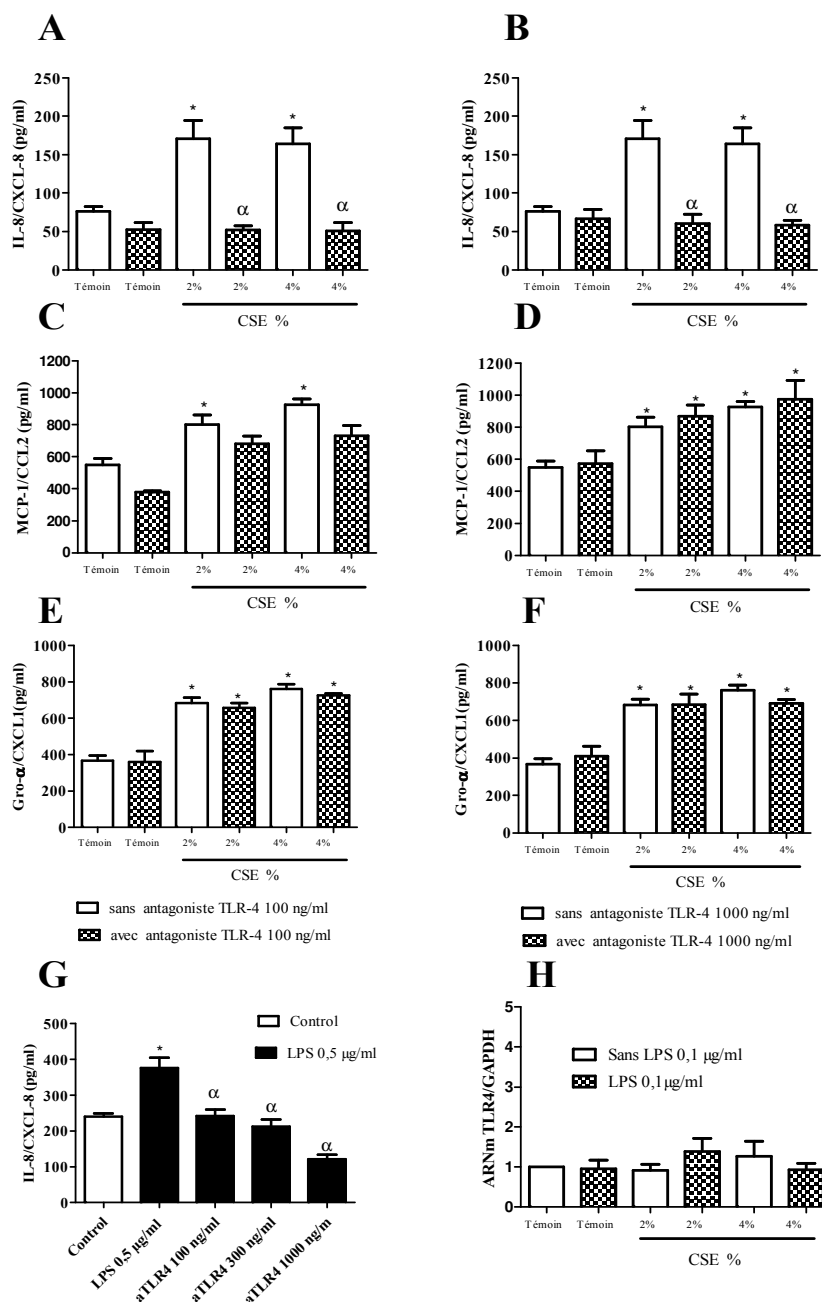


Figure 22: Effet de l'antagoniste du récepteur de TLR4 sur la libération de chimiokines induite par du LPS 0,5 µg/ml et par du CSE associé au LPS. Expression du récepteur de TLR4 par les cellules A549 stimulées avec du CSE associé au LPS. Les cellules A549 sont incubées avec le solvant (témoin, barres blanches) ou avec un antagoniste du TLR4 (barres hachurées) pendant 2 heures puis traitées avec du CSE 2% et 4 % associé au LPS 0,1 µg/ml pendant 24 heures. Les surnageants de culture sont collectés et les concentrations d'IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 et de Gro-α/CXCL1 sont mesurées par ELISA. Les cellules A549 sont incubées avec du milieu seul ou avec du CSE associée à 0,1 µg/ml de LPS, pendant 4 heures. L'expression des gènes du TLR4 est déterminée par RT-PCR. Les résultats sont normalisés en fonction du gène de la GAPDH. Les données représentent les résultats de trois expériences. *P<0,05 en comparaison avec le témoin, ^αP<0,05 en comparaison avec le groupe traité par le véhicule.

Effet des anti-inflammatoires stéroïdiens (budesonide et dexaméthasone)

Parallèlement aux effets du roflumilast N-oxide, nous nous sommes penchés sur les effets de deux anti-inflammatoires stéroïdiens, le budesonide et la dexaméthasone, sur la libération d'IL-8/CXCL8. Le prétraitement avec le budesonide ou la dexaméthasone diminue la libération d'IL-8/CXCL8 induite par du CSE/LPS.

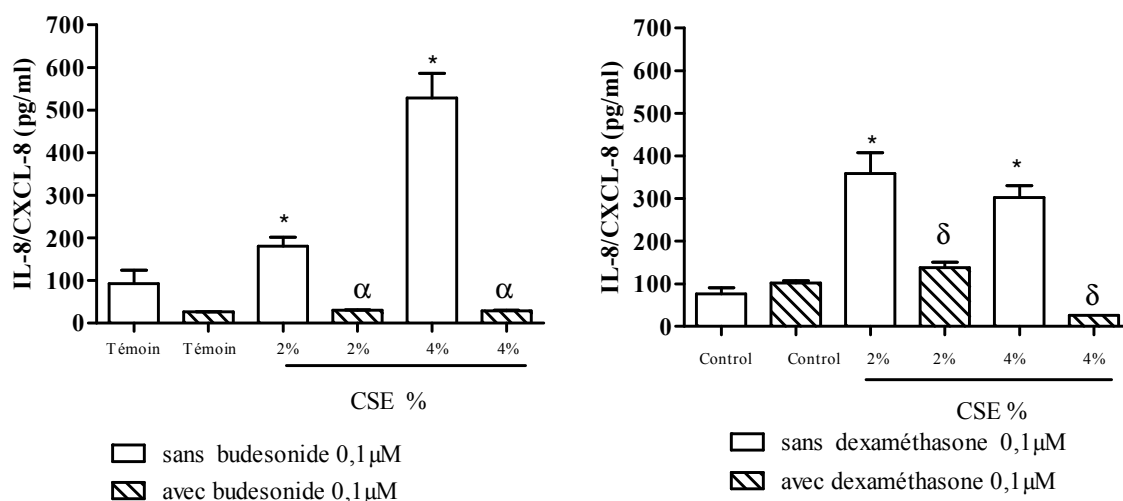


Figure 23: Effet des deux corticoïdes, le budesonide (A) et la dexaméthasone (B) sur la libération d'IL-8/CXCL8 induite par l'extrait de fumée de cigarette associé au LPS. Les cellules A549 sont incubées avec le solvant véhicule (témoin, barres blanches), budesonide ou dexaméthasone à 0,1 μ M (barres hachurées) pendant 2 heures, puis traitées avec du CSE 2 % et 4 % associé au LPS 0,1 μ g/ml pendant 24 heures. Les surnageants de culture sont collectés et les concentrations d'IL-8/CXCL8 sont mesurées par ELISA. Les données représentent les résultats de trois expériences. *P<0,05 en comparaison avec le témoin, ^{α} P<0,05 en comparaison avec CSE/LPS.

Libération de chimiokines par des cellules épithéliales bronchiques, en culture primaire stimulée par du CSE et LPS seul ou combiné

Pour nos résultats sur un autre type cellulaire pulmonaire, nous nous sommes intéressés à la libération de chimiokines par une culture primaire de cellules épithéliales bronchiques de patient atteint de BPCO (provenant de chez Lonza). Tout d'abord, nous avons stimulé ces cellules par de fortes doses de LPS d'*E. coli*. La stimulation de ces cellules épithéliales bronchiques par du LPS 0,5 µg/ml augmente la libération d'IL-8/CXCL8 et de Gro-α/CXCL1, contrairement à l'augmentation de MCP-1/CCL2 qui n'est pas significative. Nous avons conclu de ces expériences que les cellules épithéliales bronchiques, comme les cellules épithéliales alvéolaires, sont capables de produire des chimiokines. Ensuite, nous avons stimulé ces cellules avec le CSE et/ou LPS à de faibles concentrations. Le LPS 0,1 µg/ml ainsi que le CSE 2% ne sont pas capables d'augmenter de façon significative la production d'IL-8/CXCL8. En revanche le CSE seul à 4% et le CSE associé au LPS augmentent de façon significative la libération d'IL-8/CXCL8. De plus, l'augmentation d'IL-8/CXCL8 induite par le CSE 4% associé au LPS est différente de celle induite par le LPS 0,1 µg/ml seul. Par contre, la libération de MCP-1/CCL2 par les cellules épithéliales bronchiques est faible et nous n'avons observé aucune différence entre les groupes expérimentaux. Contrairement à l'IL-8/CXCL8, la libération de Gro-α/CXCL1 a été diminuée par le CSE par rapport au témoin, et le CSE est également responsable d'une diminution de Gro-α/CXCL1 induite par le LPS 0,1 µg/ml. Ces résultats confirment l'effet additif du CSE/LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8 dans une culture primaire. En revanche, la libération de MCP-1/CCL2 et de Gro-α/CXCL1 après l'exposition du CSE/LPS peut varier en fonction du type cellulaire.

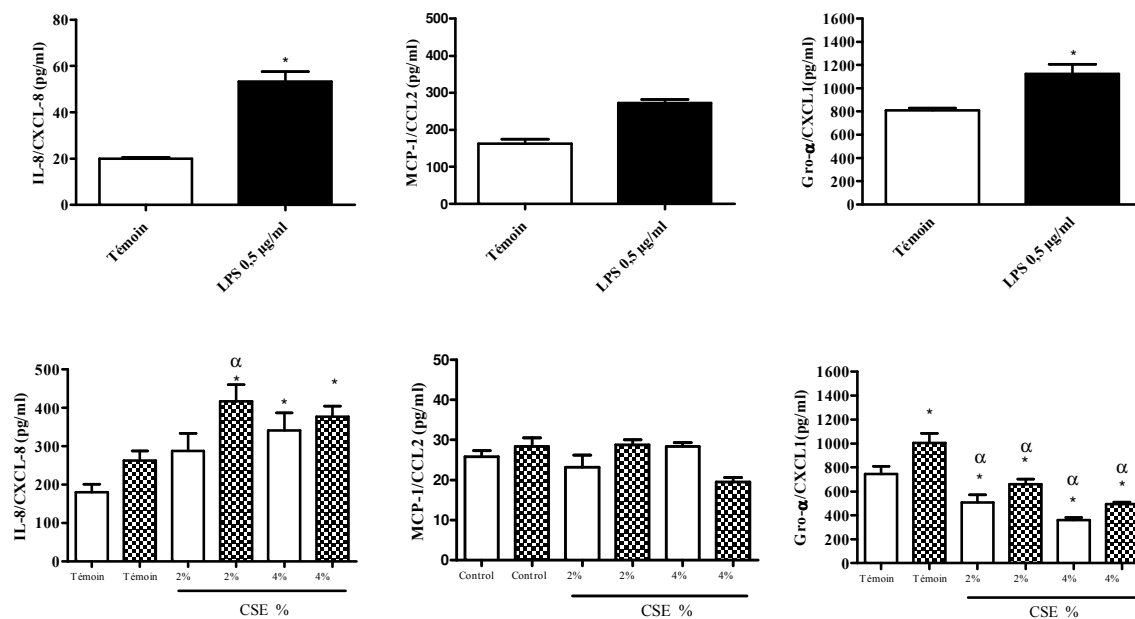


Figure 24: Effet du LPS sur la libération de chimiokines par des cellules épithéliales bronchiques d'un patient atteint de BPCO (DHBE). Effet du CSE associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8, Gro-α/CXCL1 et MCP-1/CCL2 par les DHBE. Les cellules sont incubées avec du milieu seul (Témoin) et du LPS à 0,1 µg/ml (bandes hachurées) ou 0,5 µg/ml (bandes noires) seul ou associé au CSE 2% et CSE 4% pendant 24 heures. Les surnageants de culture sont collectés et les concentrations des chimiokines sont mesurées par ELISA. *P<0,05 en comparaison avec le témoin, ^αP<0,05 en comparaison avec le LPS 0,1 µg/ml seul.

Effet du CSE seul ou associé au LPS sur la libération des cytokines et des protéases par les macrophages en culture primaire

Les macrophages résidents du poumon sont également des cibles de la fumée de cigarette et sont responsables de la libération de cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle dans la progression de la BPCO. Dans cette partie du travail, nous avons étudié les effets de la fumée de cigarette seule ou associée au LPS sur des macrophages issus du sang d'un donneur sain. Les monocytes ont été différenciés en macrophages après 7 jours d'incubation avec du GM-CSF à la concentration de 50 ng/ml. Nous nous sommes intéressés à la libération d'IL-1 β , TIMP-1, MMP-9, d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 par ces cellules, ces médiateurs étant impliqués dans le contexte physiopathologique de la BPCO. La stimulation des macrophages par du LPS 0,1 μ g/ml augmente la libération d'IL-1 β , d'IL-8/CXCL8, d'IL-6 et de TIMP-1, mais nous n'avons pas de différence quant au niveau de MMP-9 libéré. En revanche, le CSE n'a pas d'effet sur la libération d'IL-1 β , d'IL-8/CXCL8, IL-6 et MMP-9, mais nous avons observé une diminution significative de la libération de TIMP-1 par le CSE en comparaison avec le témoin. La stimulation par du CSE 2% ou 4% combiné à LPS 0,1 μ g/ml pendant 24 heures induit une augmentation de la libération de TIMP-1 comparée au LPS seul ou au témoin. Néanmoins, nous n'avons pas observé de changement sur la libération d'IL-8/CXCL8 et de la MMP-9 après l'exposition au CSE/LPS. Cependant, l'association du CSE au LPS 0,1 μ g/ml permet de diminuer la libération d'IL-6 qui était augmentée avec le LPS seul.

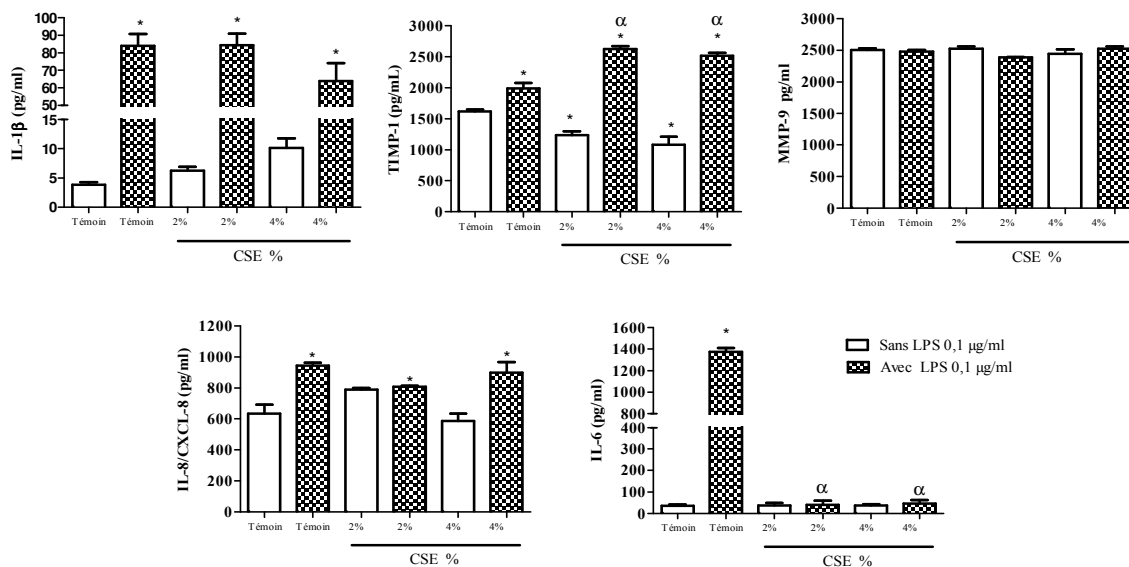


Figure 25: Effet du CSE associé au LPS sur la libération d'IL-1 β , TIMP-1, MMP-9, d'IL-8/CXCL8 et IL-6 par de macrophages. Les des monocytes issus du sang sont différenciés en macrophages après 7 jours de stimulation par du GM-CSF à 50 ng/ml. Les macrophages sont ensuite incubés avec du milieu (Témoin), du LPS à 0,1 μ g/ml, du CSE 2% et 4% seul ou associé au LPS (barres hachurées) pendant 24 heures. Les surnageant de culture sont collectés et les concentrations des différents médiateurs sont mesurées par ELISA. *P<0,05 en comparaison avec le témoin, α P<0,05 en comparaison avec le LPS seul

Effet du CSE seul ou associé au LPS sur la libération des cytokines par la co-culture des macrophages et des cellules épithéliales alvéolaires

Nous avons étudié la libération d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 dans une co-culture de macrophages et de cellules épithéliales alvéolaires (A549) stimulées par le LPS, le CSE ou l'association des deux. Nous avons observé une augmentation de la libération d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 24 heures après la stimulation par du LPS à 0,1 µg/ml. En revanche, le CSE seul n'a pas d'effet sur la libération de ces cytokines et la combinaison du CSE avec le LPS n'altère pas la libération d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 par la co-culture stimulée par du LPS 0,1 µg/ml seul.

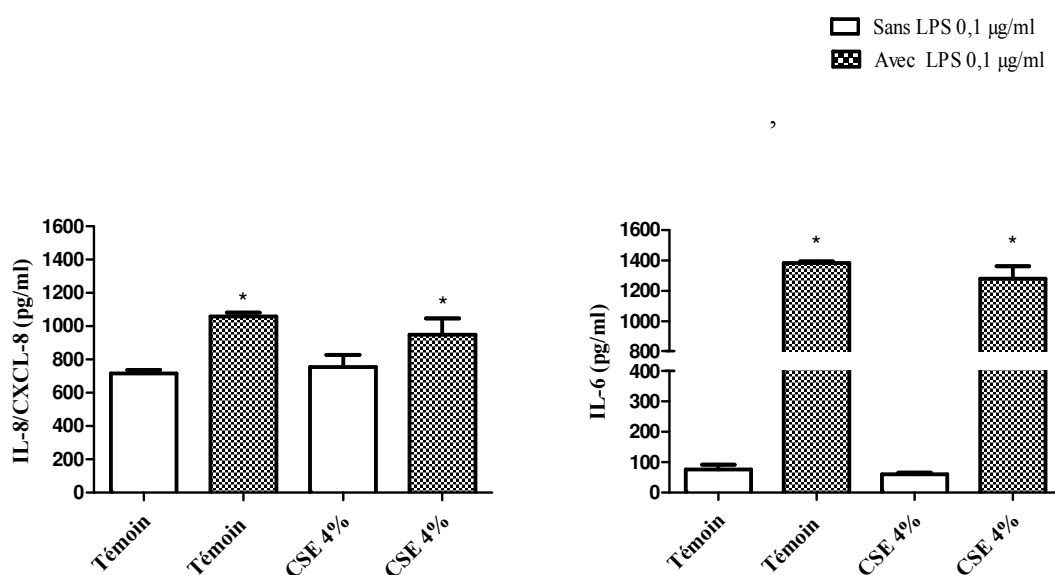


Figure 26: Effet du CSE seul ou associé au LPS sur la libération d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 par une co-culture de macrophages et de cellules épithéliales alvéolaires (A549). Les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires sont cultivés dans des chambres de culture séparées par une membrane pendant 18 heures. Les cellules sont ensuite traitées avec le milieu seul (Témoin), le LPS 0,1 µg/ml et le CSE seul ou associé pendant 24 heures. Les surnageants de culture sont collectés et les concentrations de cytokines sont mesurées par ELISA. *P<0,05 en comparaison avec le témoin.

Publication 1

Roflumilast n-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with lps through jak/stat and erk1/2 inhibition in airway epithelial cells.

Tatiana Victoni^{1*}, Florence Gleonnec¹, Manuella Lanzetti², Hermann Tenor³, Samuel Valença², Luis Cristovão Porto², Vincent Lagente¹ and Elisabeth Boichot¹.

Address : ¹UMR991 INSERM/Université de Rennes 1, Rennes, France, ² Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro Brasil, ³ Nycomed GmbH, Konstanz, Germany.

*** Corresponding author:** Tatiana Victoni UMR991 INSERM, Université de Rennes1. 2, avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. Phone : (33) 2 23 23 4593. Fax : (33) 2 23 23 53 85.

Abstract

Cigarette smoke is a major cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Airway epithelial cells and macrophages are first line cells against cigarette smoke and these cells are an important source of release pro-inflammatory cytokines. These cytokines play a role in progressive airflow limitation and chronic airways inflammation. Furthermore, the chronic colonization of airways by Gram-negative bacteria, contributes to the persistent airways inflammation and progression of COPD. The current study addressed the effects of cigarette smoke along with lipopolysaccharide (LPS) in airway epithelial as a representative *in vitro* model of COPD exacerbations. Furthermore, we evaluated the effects of PDE4 inhibitor, the roflumilast N-oxide (RNO), in this experimental model.

Epithelial A549 cells were stimulated with Cigarette smoke extract (CSE) alone (0.4% to 10%) or associated with a low concentration of LPS (0.1 µg/ml) for 24h or 4 h for measurement of chemokine protein and mRNAs and 5-60 min for protein phosphorylation. Cells were also pre-incubated with Prostaglandin E₂ alone or associate with RNO, p38, JNK and MEK inhibitor before the addition of CSE/LPS. Productions of cytokines were determined by ELISA and protein phosphorylation was observed by Western blotting and Phospho-kinase array.

CSE did not induce production of IL-8/CXCL-8 and Gro-α/CXCL1 from A549 cells, but increase production of CCL2/MCP-1. However the combination of LPS 0.1 µg/ml with CSE 2% or 4% induced an important production this chemokine that is dependent of ERK1/2 and JAK/STAT pathways but did not require JNK and p38 pathways. Moreover, RNO associated with PGE₂ reduced CSE/LPS-induced cytokine release through the inhibition of ERK1/2 and JAK/STAT pathways. We report an *in vitro* model that can reflect what happen in airway epithelial cells in COPD exacerbation. We also, showed a new pathway where CSE associated with LPS can induced cytokine release from A549 cells, which is markedly reduced by RNO.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major and a growing cause of morbidity and mortality worldwide. COPD is characterized by airflow limitation that is not fully reversible [1]. The airflow limitation is usually progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs [2].

The major triggering factor is cigarette smoking, which accounts for 80–90% of the COPD cases. The cigarette smoke causes airway inflammation by activating epithelial cells and macrophages, which by releasing proteases and free oxygen radicals cause injury of parenchyma tissue. These cells can also release inflammatory mediators, including cytokines and chemokines such as IL-8/CXCL8, monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1/CCL2) and Growth-related oncogene- α (Gro- α /CXCL1). These chemokines play a role in mechanisms leading to inflammatory process in airways and progressive airflow limitation [3,4,5]. Besides, there is now increasing amount of evidence that chronic colonization of airways by respiratory pathogens, predominantly Gram-negative bacteria, contributes to the progression of COPD and is also responsible for the persistent airway inflammation [6,7]

Several signaling pathways, such as mitogen activated protein kinase (MAPK), control the expression of these chemokines as demonstrated by taking advantage of selective inhibitors or siRNA strategies [8,9,10,11]. Indeed, inhibitors of ERK 1/2 and p38 MAP kinases decreased the release of cytokines induced by cigarette smoke in airway epithelial cells [12,13]. Other protein kinases may be involved in inflammatory responses like Src family kinases, JAKs (Janus kinases) as well as their downstream transcription factors of the STAT (signal transducer and activator of transcription) family [14,15].

Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors that prevent the degradation of cAMP will enhance the anti-inflammatory action of this second messenger. Neutrophils, macrophages, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, epithelial cells or fibroblasts in the lungs and airways

express PDE4 and their functions are favorably modulated by PDE4 inhibitors such as roflumilast [16], which may finally translate into a clinical benefit in COPD. Indeed, roflumilast robustly reduced the rate of acute exacerbations in the frequent exacerbation phenotype of COPD as documented in large clinical trials [17].

In vivo, roflumilast mitigates lung infiltration by inflammatory cells (neutrophils, macrophages, dendritic cells, B and T-cells) and airspace enlargement in mice exposed to tobacco smoke over a period of 6 months [18]. *In vitro*, the PDE4 inhibitor enhances ciliary beat frequency and preserves the ciliated cell phenotype compromised by tobacco smoke extract in differentiated human bronchial epithelial cells [19] and reduces MUC5AC expression [12]

The airway epithelium is the first line of defense against inhaled environmental particles such as tobacco smoke and bacteria. Thus, airway epithelial cells represent an important source of cytokines and chemokines in the context of COPD [20,21]. The precise role of epithelial cells in the complex interplay between tobacco smoke, pathogens and the inflammatory microenvironment has not yet been fully explored. The aim of this study was to evaluate the effects of cigarette smoke extracts associate with LPS, a constituent of gram negative bacteria cell walls on airway epithelial cells. Furthermore, the effects of the PDE4 inhibitor roflumilast n-oxide (RNO), the active metabolite of roflumilast were explored in this experimental model.

To this end, we have examined the effects of combining cigarette smoke extract (CSE) with a low concentration of lipopolysaccharide (LPS) on human alveolar epithelial type II like cells (A549). We showed that the combination of CSE with LPS further enhanced the release of several chemokines by A549 cells, in particular IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 to which an activation of the ERK1/2 and JAK/STAT pathways may have

contributed. Moreover, RNO associated with Prostaglandin E₂ (PGE₂) reduced the release of these chemokines through the inhibition of ERK1/2 and JAK/STAT pathways.

Materials and methods

Reagents Roflumilast-N-oxide (RNO) was provided by Nycomed (Konstanz, Germany). F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification cell culture medium, antibiotics, glutamine, and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA). Lipolysaccharide from E. coli 055 :B5, Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT), SB-203580, , SP-600125, and U0126 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The specific antibodies against phospho-(p44/42) ERK1/2, (p44/42) ERK1/2, phospho-p38 MAP kinase, p38 MAP kinase, phospho-SAPK/JNK, SAPK/JNK, were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Acrylamide, SDS, Tris, HEPES, and BSA were from Eurobio (Les Ulis, France). Bradford protein assay and Precision Plus Protein Dual Color Standards were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Cell culture. The human alveolar epithelial cell line (A549) was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in F-12K supplemented with 10% FCS, 1% antibiotics, 2mM L-glutamine, and 10 mM HEPES at 37°C and at 5% CO₂. 1x10⁵ cells were transferred to 24-well plates and grown to confluence for the experiments.

Cell culture and treatments. CSE was prepared as previously reported [22,23]. In brief two 2R1 cigarettes (U Kentucky, USA) was bubbled through 20 ml F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification and the resulting suspension (100% CSE) was filtered through a 0.2 µm filter, and diluted with complete media. A549 cells were stimulated with CSE (0.4 % to 10%) and with or without LPS (0.1 µg/ml) for 4h or 24h. Cells were also pre-incubated with RNO (1 nM or 1 µM) with PGE₂ (10 nM) or without or vehicle for 2h before the addition of CSE/LPS. To explore possible signaling pathways involved, A549 cell were pre-incubated with either the p38 kinase inhibitor SB203580 (10 µM and 20 µM) or the JNK inhibitor SP600125 (2 µM and 4 µM) or the MEK inhibitor U0126 (3 µM and 5 µM) for 2 hours before being stimulated with CSE/LPS. All experiments were performed in serum-free

medium, triplicate and repeated at least 3 times. At the end of the incubation period culture supernatants were harvested and stored at -80°C until further analysis.

Measurement of chemokine protein and mRNAs. The concentrations of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, Gro- α /CXCL1 in the culture supernatants were measured by ELISA from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom). Total RNAs were isolated from A549 cells using a commercially available kit (Promega, Madison, WI, USA). RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Total RNAs (1 μ g) was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative RT-PCR was performed by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems). Primer pairs for each transcript were chosen with NCBI software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. IL-8/CXCL8 primers forward 5'-AAG AAA CCA CCG GAA GGA AC-3', reverse 5'-AAA TTT GGG GTG GAA AGG TT-3'; MCP-1/CCL2 primers forward 5'-TGT CCC AAA GAA GCT GTG ATC-3', reverse 5'-ATT CTT GGG TTG TGG AGT GAG-3'; Gro- α /CXCL1 primers forward 5'-AAC CGA AGT CAT AGC CAC AC-3', reverse 5'-CCT CCC TTC TGG TCA GTT G3'; GAPDH primers forward 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3', reverse 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'). Amplification curves were read with the StepOne software V2.1 using the comparative cycle threshold method. The relative quantification of the steady-state mRNA levels was normalized against GAPDH mRNA.

Evaluation of protein kinase phosphorylation by Western blotting. A549 cells were incubated with medium alone, CSE 4%, LPS 0.1 μ g/ml or the combination of both for 5, 15, 30, 60 and 120 min. Then, cells were washed with PBS and lysed with lysis buffer (Novagen, San Diego, CA, USA) containing 1% protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) for 15 min on ice. Equal amounts of cell lysate (50

µg) were separated by a 5% or 10% SDS-PAGE gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane, which was further incubated for 1 hour with 5% BSA or 5% w/v nonfat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 and then for 2h at room temperature with an antibody specific. After washing, the membranes were incubated for 2h with a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse/rabbit antibody. Blots were then incubated with an enhanced chemiluminescence solution for 1 min and exposed.

Human Phosphoprotein Array. Cells were pre-incubated with RNO (1 nM) and PGE₂ (10 nM) or vehicle for 2h before the addition of CSE (4%), LPS (0.1 µg/ml) and CSE/LPS. Cell lysates (500 µg of total proteins per array) were applied to the phosphoprotein array following the manufacturer's instructions (Proteome Profiler Human Phosphokinase Array kit, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom).

Viability assay by the tetrazolium salt method. Cytotoxicity of CSE tested on A549 cells was assessed by using the tetrazolium salt method (MTT) viability test. MTT was added to the culture medium at a final concentration of 0.5 mg/ml and incubated at 37°C for 2 h. The reaction product of MTT was extracted in dimethylsulfoxide (DMSO) and the OD was spectrophotometrically measured at 570 nm, with DMSO as a blank. Viability was expressed as percentage of the values (corresponding to 100%) of untreated cells.

Statistical analysis. The results are expressed as means ± SEM. Analysis of treatment effects between groups was performed with a one-way ANOVA. Comparison of treatment interactions was done by tukey post test. For each analysis, *P* values less than 5% were considered statistically significant.

Results

Effects of the combination of LPS with CSE on the production of cytokines from epithelial cells.

Incubation of A549 cells with different concentration of CSE (0.1%-10%) for 24h did not enhance the release of IL-8/CXCL8 and Gro- α /CXCL1 (Fig 1A and C), but significantly increase the release of MCP-1/CCL2 (Fig 1B). CSE whatever the concentrations did not induced toxicity (Fig 1D). As expected, LPS (10 ng/ml-10 μ g/ml) concentration-dependently increased the release of IL-8/CXCL8 from A549 cells (Figure 1E). For study evaluating the effects of CSE associated with LPS in further experiments, the concentration of 0.1 μ g/ml LPS was selected to not significantly enhance the release of these chemokines over control (Fig 2A-F). The incubation of A549 epithelial cells with CSE at 2% or at 4% in combination with LPS at 0.1 μ g/ml for 24h significantly enhanced the release of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 into the culture medium that was more than additive for IL-8/CXCL8 and Gro- α /CXCL1 at both CSE concentrations. As an example with respect to IL-8/CXCL8 release, at baseline 62.5 ± 8.2 pg/ml accumulated in the culture medium over 24 h, and in presence of CSE at 2% or LPS at 0.1 μ g/ml 83.9 ± 15.0 pg/ml or 102.5 ± 14.92 pg/ml, respectively were collected. However, in the combined presence of CSE at 2% and LPS at 0.1 μ g/ml the concentration of IL-8/CXCL8 in the culture medium increase up to 214.1 ± 27.7 pg/ml (Fig 2A). In contrast, we did not observed any significant changes in mRNA expression levels for IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 under each condition including the combination of LPS with CSE when measured at 4 h of incubation time (figure 2D-F).

The release of chemokines induced by the combination of CSE and LPS was contingent on ERK1/2 but did not require JNK and p38 pathways.

To analyse the signalling pathways likely involved in CSE/LPS-induced chemokine release, the expression of MAP kinases such as p38 kinase, JNK and (p44/42) ERK 1/2 and the abundance of their respective phosphorylated forms was analysed by Western blotting. Stimulation of A549 cells with CSE (4%) or LPS (0.1 µg/ml) alone or in combination over 5 to 120 min neither increased p38 nor JNK phosphorylation (Fig 3A and B,) (data 60 and 120 min not shown). On the other hand, CSE (4%) and LPS (0.1 µg/ml) alone and when combined (CSE/LPS) were found to result in a rapid and transient increase in phospho p44/42 ERK1/2 that was observed at 5, 15 and 60 min but not at 30 and 120 min incubation time in A549 cells (Fig 2C and D). By taking advantage of specific inhibitors the contribution of ERK1/2, p38 kinase and JNK to CSE/LPS-induced chemokine release was further investigated. First of all, the MEK1/2 inhibitor U0126 (3 or 5 µM) abolished the CSE/LPS-induced release of IL-8/CXCL8 (Fig 4B) and Gro- α /CXCL1 (Fig 4H) below baseline ($p < 0.05$) while the release of MCP-1/CCL2 (Fig 4E) was not significantly reduced. The p38 MAPK inhibitor SB203580 at 10 µM or 20 µM did not affect CSE/LPS-induced IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 release (Fig 4C, 4F and 4I). The JNK inhibitor, SP600125, at 4 µM but not at 2 µM significantly reduced the CSE/LPS-induced release of IL-8/CXCL8 (Fig 4A), but it has no effect in MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 release (Figure 4D and 4G).

Activation of the JAK/STAT pathway following stimulation of A549 epithelial cells with CSE and LPS

We then further explored intracellular signalling pathways following stimulation of A549 cells with CSE (4%) (Fig 5A), LPS (0.1 µg/ml) (Fig 5B) or their combination (Fig 5C), or vehicle (control) for 40min. We used a commercially available human phosphoprotein array kit that allowed to semiquantitatively assess the levels of phosphorylated representatives of the MAP Kinases, Src family and JAK/STAT pathways amongst others. At

least the phosphorylation of sixteen phosphoproteins were increased after exposure with CSE/LPS for 40 min and twelve of them are related to the JAK/STAT pathway. On the other hand, the phosphorylated forms of eight and eleven proteins were increased with LPS 0.1 mg/ml (Fig 5A) and CSE 4% (Fig 5B) alone, respectively. For some proteins the intensity of the signal reflecting their phosphorylation has been much stronger with CSE/LPS in combination compared to each of these stimuli on their own (examples are HSP27, CREB, lyn, STAT5a, STAT2). For phosphorylated STAT3, the observations from the phosphoprotein array were confirmed using Western blotting (Fig 6A, B). At least following a 1 h incubation time with CSE/LPS there has been an increase in phospho STAT3 that was however, not observed with either CSE or LPS alone. Taken together, these data suggest that the combination of CSE and LPS may induce an activation of the JAK/STAT signaling pathway.

Effects of RNO on chemokine release and protein phosphorylation induced by the combination of CSE and LPS in A549 cells.

Finally, we investigated the effects of a PDE4 inhibitor, RNO in conjunction with PGE₂ (1 nM) on the release of chemokines and the phosphorylation of a range of proteins following incubation of A549 cells with the combination of CSE (at 2% or 4%) and LPS (0.1 µg/ml). Cells were pre-incubated with RNO (10 nM or 1 µM) and PGE₂ (10 nM) and then stimulated with CSE (2% or 4%) together with LPS (0.1 mg/ml) for 24 hours. In the presence of PGE₂ (10 nM) and RNO at 1 nM (Fig 7A, B and C) or 1 µM (Fig 7 D, E and F) elicited a partial, but significant inhibition of the release of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro-α/CXCL1 into the culture medium of A549 cells stimulated with CSE and LPS. In contrast PGE₂ alone does not modify the cytokine release (data not shown).

Whether RNO (1 nM) along with PGE₂ (10 nM) would affect the JAK/STAT and ERK1/2 pathways was next investigated. In the phosphoprotein array, RNO markedly reduced

the signal intensity for six of the eight phosphorylated STAT isoenzymes analysed, including STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5ab, and STAT6, that were increased after exposure for 40 min with CSE/LPS. Moreover, RNO decreased the signal intensity of MAPK and other kinases protein that can be regulated by STAT, as Lyn, Fyn and Yes, components of Src-family, another pathway that was increased after exposure of A549 cells to CSE and LPS (Fig 8).

Discussion

We have investigated the effects of combining cigarette smoke extract (CSE) with a subthreshold, low concentration of LPS (CSE/LPS), on human alveolar type II like epithelial cells, A549. We have observed that such a combination enhanced the release of several chemokines from A549 cells, in particular IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 by activation of the ERK1/2 and JAK/STAT pathways in comparison to CSE or LPS alone. We also observed that roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor along with PGE₂ partly reduced the release of chemokines induced by CSE/LPS and partly involved the inhibition of ERK1/2 and JAK/STAT pathways.

Cigarette smoke impairs host immune defense and recurrent infections of the airways and plays a crucial role in the progression of COPD [24]. In this study, we developed an *in vitro* model which can reflect what happen in COPD exacerbations where airway epithelial cells could face both tobacco smoke and bacterial pathogens. We demonstrated that cigarette smoke alone is not sufficient to induce the release of chemokines such as IL-8/CXCL8 and Gro- α /CXCL-1. These results are in line with the study of Moodie (2004) and colleagues, showing that cigarette smoke-conditioned medium did not affect IL-8/CXCL8 or IL-6 expression in human lung epithelial cells *in vitro* [25]. On the other hand, to CSE adding a low concentration of LPS (0.1 μ g/ml), that on its own did not affect release of the chemokines, elicited a significant increase in IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 release. Our findings are consistent with those of Pace *et al.*, (2008) who found an increased release of IL-8/CXCL8 from 16-HBE cells when LPS was associated with CSE [26]. However, Pace & colleagues used airway epithelial cells of bronchial origin while the cells in our study were from alveolar origin. In contrast, other studies report an inhibition of an LPS-induced cytokine release by CSE in airway epithelial cells [27,28]. The concentrations of LPS used in the latter studies were 10-100-fold higher compared to the 0.1 μ g/ml of LPS used in

the current investigation that may result in a differential use of intracellular signaling pathways or levels of cellular stress. Indeed, in healthy volunteers the inhalation of LPS at 5-50 µg/ml elicits neutrophilic airway inflammation [29]. Based on these studies, we conclude that concentrations of LPS between 1 µg/ml and 10 µg/ml would be extremely high for *in vitro* experiments with human cells. Moreover, LPS up to 1 µg/ml was not different from CSE 4% associated with LPS 1 µg/ml in chemokine release (data not shown). Under the current experimental conditions the increase in chemokine release from A549 cells stimulated with CSE and LPS was not associated with an enhanced mRNA expression, even though there was a trend in A549 cells incubated with both CSE and LPS. These observations might indicate that the constitutive mRNA is sufficient to elicit the expression of chemokines. Alternatively, the time-course of mRNA versus protein expression may be rather different and the increase of mRNA if it exists may have occurred earlier than after 4h.

The production of cytokines and chemokines may be regulated by a range of signal transduction pathways such as MAP Kinases [9] [30]. Thus, we examined by Western blotting the phosphorylation pattern of p38 kinase, JNK and ERK1/2 in response to CSE/LPS. Although the generation of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro-α/CXCL1 was reported to depend on p38 kinase and JNK in several experimental models this was not the case under our conditions [9,30,31]. In our experimental model by using either Western blotting or selective inhibitors, we found that the formation of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro-α/CXCL1 by A549 cells stimulated with CSE/LPS is independent from both JNK and p38 kinase activation. However, we observed a decrease in CSE/LPS-induced IL-8/CXCL8 release after incubation with the JNK inhibitor, SP600125 at 4 µM. It is therefore possible that at this concentration of SP600125 (4 µM), it might also exerts an inhibitory effect on the ERK1/2 pathway. Indeed, U0126, an inhibitor of the ERK1/2 pathway at concentrations of 3 and 5 µM decreased the release of IL-8/CXCL8 and Gro-α/CXCL1 from CSE/LPS-stimulated A549

cells indicating that the ERK1/2 pathway is involved in the generation of these chemokines under our conditions. On the other hand U0126 failed to reduce the release of MCP-1/CCL2. This observation and the relatively low degree of ERK1/2 activation suggest that other pathways may also contribute to the generation of these chemokines.

Our hypothesis was confirmed by the analysis of phosphoprotein arrays following stimulation of A549 cells with CSE/LPS. For example the phosphorylation of eight STAT proteins (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT5ab, and STAT6) was increased after exposure of A549 cells to CSE and LPS. These results suggest that in addition to ERK1/2, the JAK/STAT pathway is involved in the CSE/LPS-induced chemokine release. Indeed, the non-receptor tyrosine kinases such as JAK were implicated in the generation of cytokines or chemokines [32,33]. The findings from the protein arrays have been confirmed by Western blotting. Our analysis was focused on STAT3, because this signaling molecule is associated to epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR transactivation pathway is involved in expression of proinflammatory cytokines, including IL-8/CXCL8 in response to cigarette smoke [34]. Moreover EGFR signaling is commonly involved in both the activation of extracellular signal-related kinases 1/2 (ERK1/2) and Src-family, two other pathways that may be involved in CSE/LPS exposure [35,36]. Indeed Goyal *et al.*, (2010) showed that in a human intestinal epithelial cell line stimulated with fragments of *E. coli* the expression of IL-8/CXCL8 was operated through STAT-3 and ERK1/2 activation [37]. Moreover, STATs can be independently activated by JAKs, most notably by c-Src [35,38]. We suggest that the increase of five Src family Kinases (Src, Lyn, Lck, Fyn and Yes) at 40 min of exposure with the combination of CSE/LPS as showed in protein arrays, might account for the STAT3 phosphorylation at 60 min as observed by Western blotting. Similarly, Src have been shown to activate MAP Kinases in response to various stimuli [39,40].

We suggest that activation of ERK1/2 pathway by the combination of CSE with LPS, may involved Src family and Stat 3. Indeed, we observed an increased activation of this pathway by western blotting at 60 min and decrease of chimiokines release at 24h after incubation with the ERK1/2 inhibitor. This hypothesis is supported by Ovrerik et al. (46) suggesting that the activation of ERK1/2 is dependent of the Scr family for the IL-8/CXCL8 production by A549 stimulated with silica. In this condition, the low level of activation observed for ERK1/2 in our study, could be due to the delayed (more than 120 min) activation which is also dependent of the activation of Scr family and Stat3 pathways

We also observed the activation of the transcription factor cyclic AMP response element-binding protein (CREB), suggesting the involvement of cAMP in this model. It is possible that CREB is involved in the release of cytokines observed in our study. Indeed, Sun *et al.*, (2008) observed that CREB regulates CXC chemokine gene expression in A549 cells [41].

The anti-inflammatory profile of PDE4 inhibitors is broadly documented [42] and it is support by the recent approval of one of them, roflumilast, in severe COPD where it reduces the risk of exacerbations [17]. Indeed, clinical trials reported a reduced exacerbation rate and an improved lung function with roflumilast in severe COPD [43]. The preclinical pharmacology of roflumilast and its active metabolite, roflumilast N-oxide with a wealth of anti-inflammatory effects has been described in numerous studies [44,45]. Because an abnormal inflammatory response largely governs the pathophysiology of COPD and roflumilast is approved for patients with symptomatic, severe COPD with frequent exacerbations, we explored the effects of roflumilast N-oxide in our *in vitro* experimental model of airway epithelial cells stimulated with CSE and LPS. Roflumilast N-oxide partly inhibited the release of chemokines after stimulation of A549 cells with CSE and LPS. Recently, roflumilast and roflumilast N-oxide were described to reduce the LPS-induced

release of CCL2, 3, 4, CXCL10 and TNF- α from human lung macrophages [44]. Roflumilast and roflumilast N-oxide prevent the generation of cytokines and chemokines *in vitro* and *in vivo* secondary to an increase in cAMP [45]. Signal transduction affected downstream of PDE4 inhibition specifically for roflumilast or roflumilast N-oxide has rarely been investigated but some have shown an inhibition of p38 and p44/42-MAPK pathways [12]. Based on our findings, we hypothesized that the inhibitory effect of roflumilast may have been caused by an inhibition of the phosphorylation of critical kinases mainly those of the JAK/STAT activation pathway. Indeed, roflumilast N-oxide at 1 nM (in the presence of 10 nM PGE₂) prevented the phosphorylation of seven STAT proteins and five Scr family proteins.

Conclusions

In conclusion, our study demonstrated that CSE/LPS can stimulate A549 epithelial cells to release cytokines which participated to the airway inflammatory process in COPD by activation JAK/STAT and ERK 1/2 pathways. We report an *in vitro* model that can reflect what happen in airway epithelial cells in COPD exacerbation. We also showed a new pathway through which cigarette smoke associate with LPS can induced cytokines release from A549 cells. Furthermore, roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by CSE combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition.

Acknowledgments:

This study was supported INSERM. The authors M.L., T.V., V.L., L.C.P., and S.S.V. are grateful to the CAPES  COFECUB for funding and bilateral agreement (Brazil  France).

Reference

1. Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4: 1241-1243.
2. Barnes PJ (2000) Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 343: 269-280.
3. Barnes PJ (2009) The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 631-638.
4. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, et al. (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350: 2645-2653.
5. Reynolds PR, Cosio MG, Hoidal JR (2006) Cigarette smoke-induced Egr-1 upregulates proinflammatory cytokines in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 314-319.
6. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, et al. (2002) Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 57: 759-764.
7. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barron J, Achotegui V, et al. (1999) Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 13: 343-348.
8. Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM (2003) Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF-kappaB in IL-1beta-induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir Med* 97: 811-817.
9. Issa R, Xie S, Lee KY, Stanbridge RD, Bhavsar P, et al. (2006) GRO-alpha regulation in airway smooth muscle by IL-1beta and TNF-alpha: role of NF-kappaB and MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L66-74.
10. Mercer BA, D'Armiento JM (2006) Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 1: 137-150.
11. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, et al. (2000) SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L895-902.
12. Mata M, Sarria B, Buenestado A, Cortijo J, Cerda M, et al. (2005) Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax* 60: 144-152.
13. Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS (2002) Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 3: 22.
14. Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K (2006) Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 533: 118-132.
15. Severgnini M, Takahashi S, Roza LM, Homer RJ, Kuhn C, et al. (2004) Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1282-1292.

16. Torphy TJ (1998) Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 351-370.
17. Field SK Roflumilast, a Novel Phosphodiesterase 4 Inhibitor, for COPD Patients with a History of Exacerbations. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 5: 57-70.
18. Martorana PA, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G (2005) Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 848-853.
19. Milara J, Armengot M, Banuls P, Tenor H, Beume R, et al. Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol* 166: 2243-2262.
20. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, et al. (2004) Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 405-412.
21. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 80: 59-70.
22. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, et al. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther* 23: 222-228.
23. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER (1998) Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 819-825.
24. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, et al. (2006) Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1114-1121.
25. Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, Biswas SK, et al. (2004) Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J* 18: 1897-1899.
26. Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, et al. (2008) Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology* 124: 401-411.
27. Laan M, Bozinovski S, Anderson GP (2004) Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol* 173: 4164-4170.
28. Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, et al. (2004) Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 500-509.
29. Korsgren M, Linden M, Entwistle N, Cook J, Wollmer P, et al. Inhalation of LPS induces inflammatory airway responses mimicking characteristics of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Physiol Funct Imaging* 32: 71-79.
30. Ip WK, Wong CK, Lam CW (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin Exp Immunol* 145: 162-172.
31. Bhattacharyya S, Gutti U, Mercado J, Moore C, Pollard HB, et al. MAPK signaling pathways regulate IL-8 mRNA stability and IL-8 protein expression in cystic fibrosis lung epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L81-87.

32. Choi SY, Lim JW, Shimizu T, Kuwano K, Kim JM, et al. Reactive oxygen species mediate Jak2/Stat3 activation and IL-8 expression in pulmonary epithelial cells stimulated with lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma pneumoniae*. *Inflamm Res* 61: 493-501.
33. Biswas SK, Sodhi A (2002) Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol* 2: 1095-1107.
34. Richter A, O'Donnell RA, Powell RM, Sanders MW, Holgate ST, et al. (2002) Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 85-90.
35. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12: 5268-5272.
36. Osherov N, Levitzki A (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem* 225: 1047-1053.
37. Goyal A, Konar M, Setia A, Narang A, Ghosh S Galactose specific adhesin of enteroaggregative *E. coli* induces IL-8 secretion via activation of MAPK and STAT-3 in INT-407 cells. *Biochim Biophys Acta* 1800: 574-579.
38. Oyaizu T, Fung SY, Shiozaki A, Guan Z, Zhang Q, et al. Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 38: 894-905.
39. Kitagawa D, Tanemura S, Ohata S, Shimizu N, Seo J, et al. (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J Biol Chem* 277: 366-371.
40. Liu R, Aupperle K, Terkeltaub R (2001) Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells. *J Leukoc Biol* 70: 961-968.
41. Sun H, Chung WC, Ryu SH, Ju Z, Tran HT, et al. (2008) Cyclic AMP-responsive element binding protein- and nuclear factor-kappaB-regulated CXC chemokine gene expression in lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 1: 316-328.
42. Diamant Z, Spina D PDE4-inhibitors: a novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulm Pharmacol Ther* 24: 353-360.
43. Gross NJ, Giembycz MA, Rennard SI Treatment of chronic obstructive pulmonary disease with roflumilast, a new phosphodiesterase 4 inhibitor. *COPD* 7: 141-153.
44. Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, et al. Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-alpha from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 165: 1877-1890.
45. Hatzelmann A, Morcillo EJ, Lungarella G, Adnot S, Sanjar S, et al. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 23: 235-256.

Figure 1

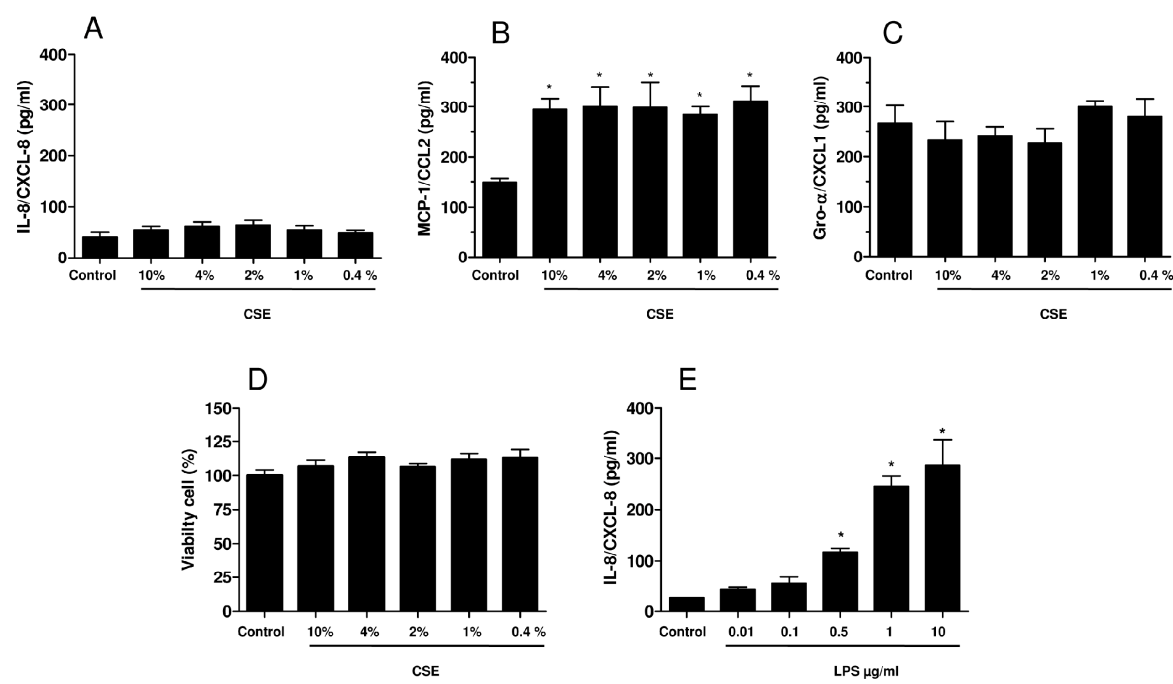


Figure 2

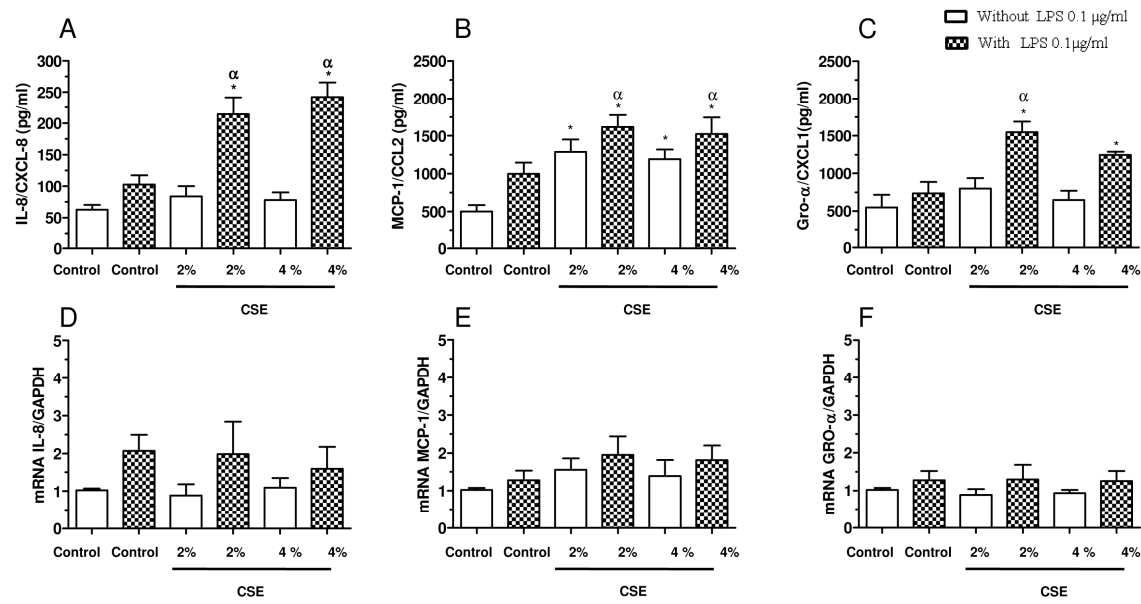


Figure 3

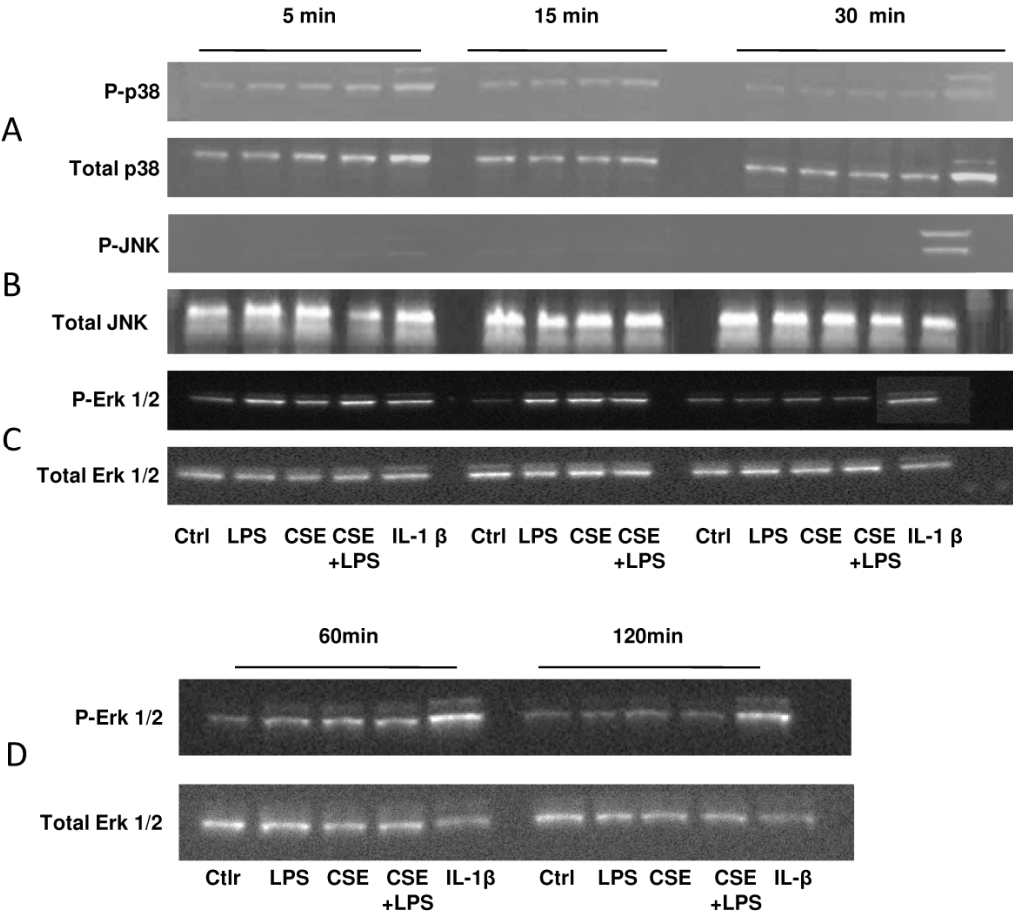


Figure 4

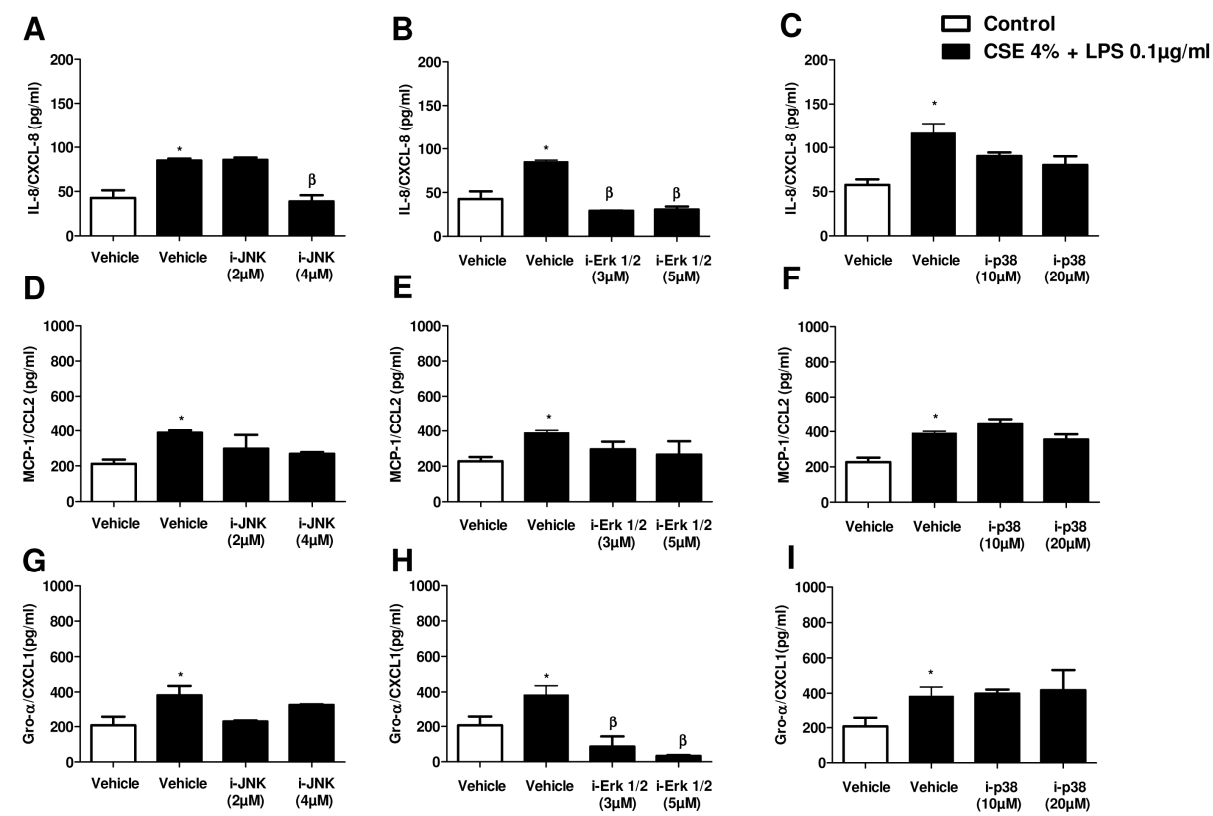


Figure 5

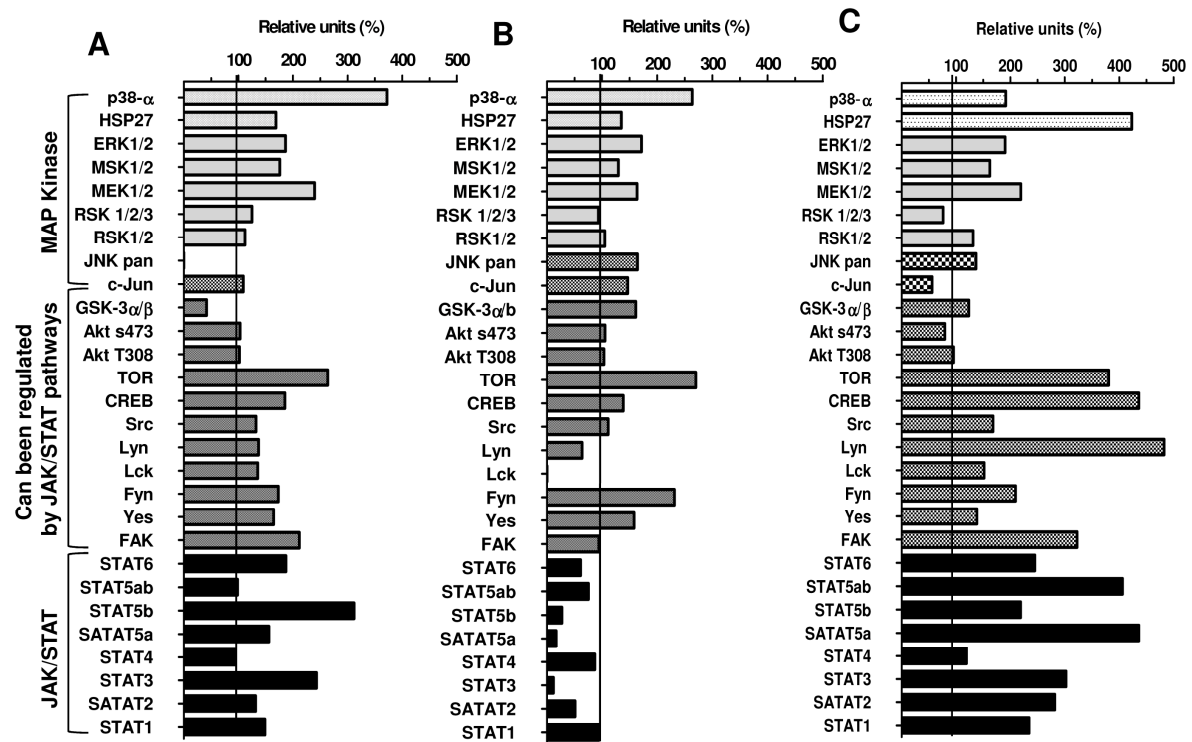


Figure 6

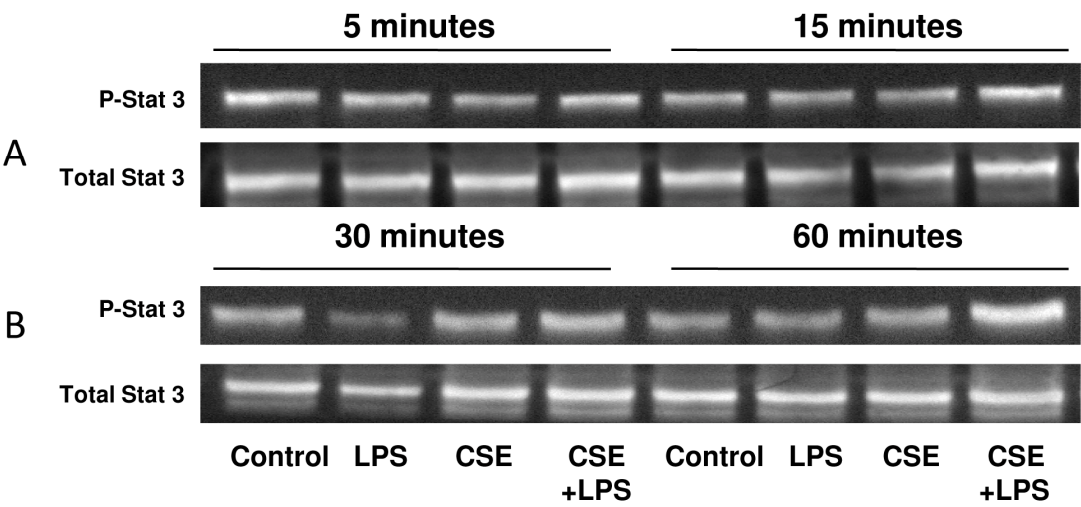


Figure 7

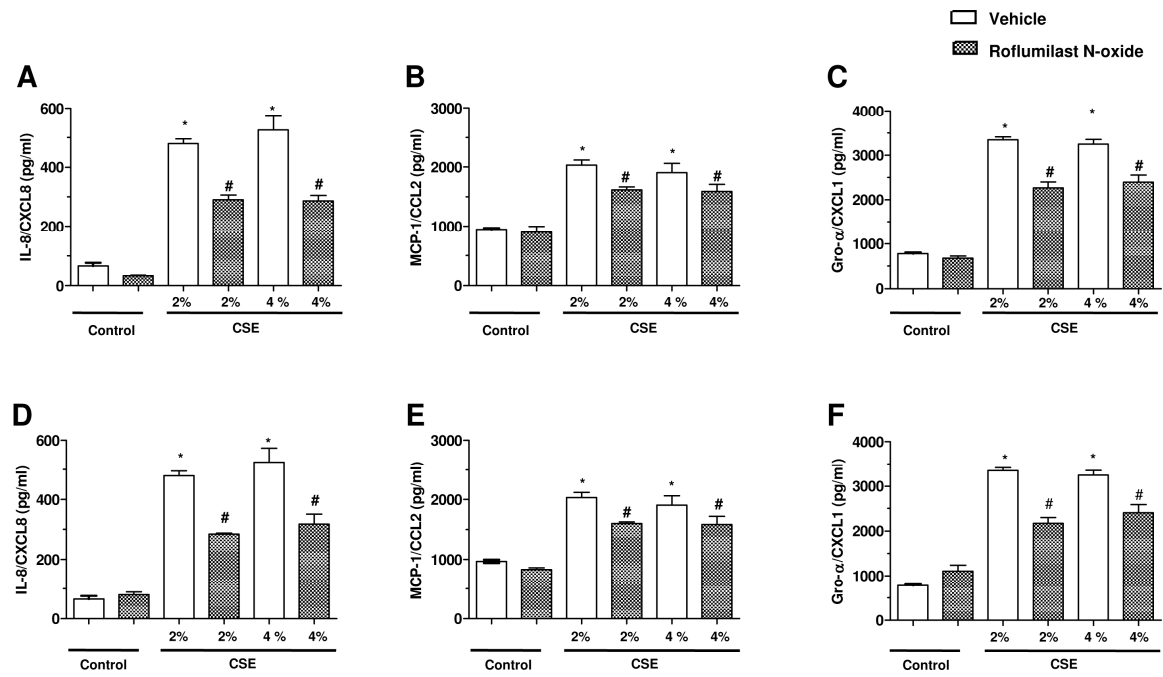
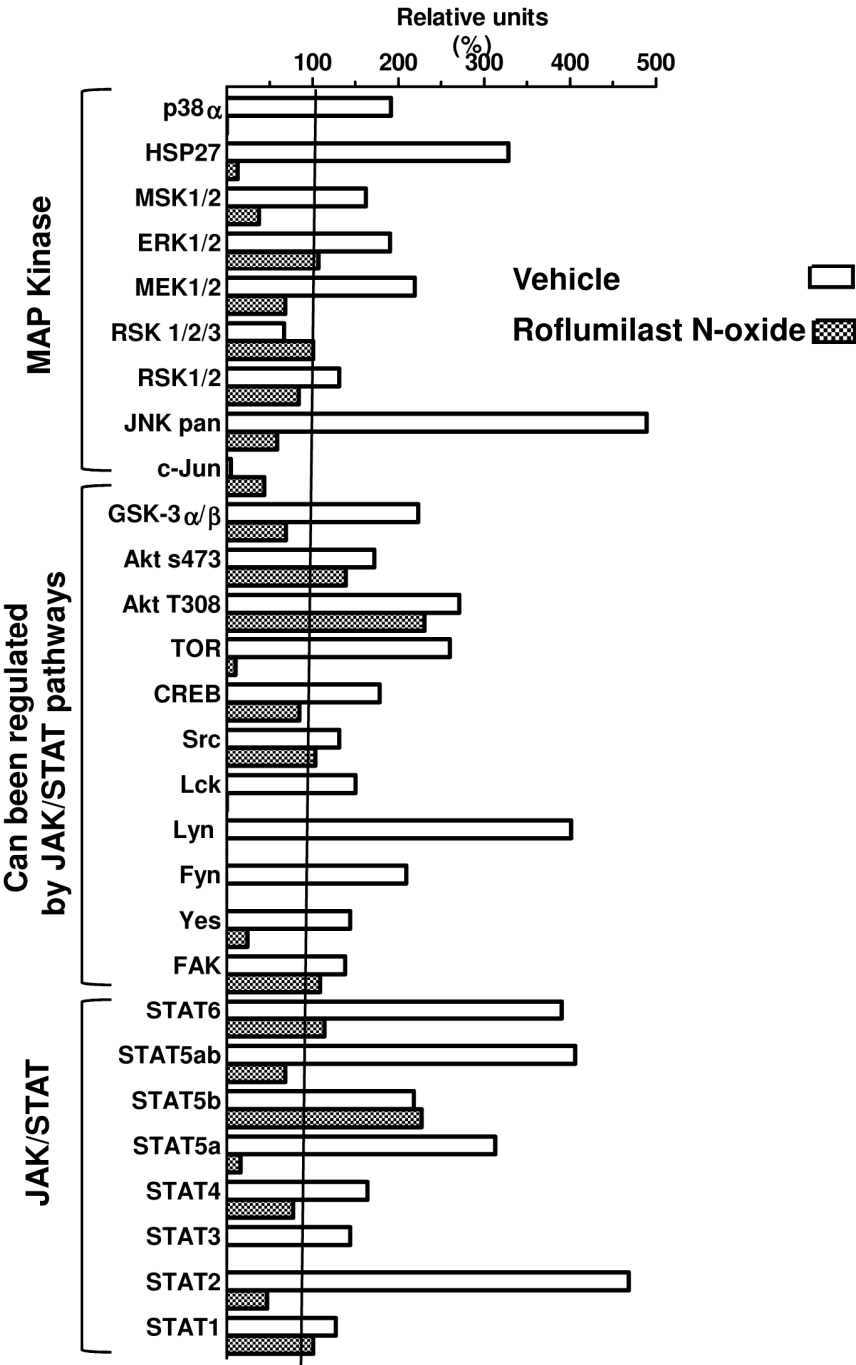


Figure 8



Figures legends

Figure 1. Effects of CSE (0.1%-10%) and LPS (10ng/ml-10µg/ml) on chemokines release and cell viability. Serum-starved A549 cells were incubated with medium alone (control) or with different concentration of CSE (0.1%-10%) and LPS (10ng/ml-10µg/ml) for 24 h. The culture supernatants were collected and the concentrations of IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 were measured by ELISA (A, B, C and D) and viability was determined by MTT test (E). The data represent the mean \pm SEM of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared to control.

Figure 2. The CSE/LPS induced chemokine release from A549 cells, but did not affect mRNA expression. Serum-starved A549 cells were incubated with medium alone (control), CSE 2% or 4% (blank bars), LPS 0.1 µg/ml alone or in combination with 2 or 4% of CSE (hatched bars) for 24 h. The culture supernatants were collected and the concentrations of chemokines were measured by ELISA (A, B and C). The data represent the mean \pm SEM of 7 experiments. A549 cells were stimulated for 4h. mRNA expression was then determined by real-time quantitative RT-PCR (D, E and F). The results are normalized to the gene expression of GAPDH. The data represent the mean \pm SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared to control, α $p < 0.05$ compared to LPS 0.1 µg/ml.

Figure 3. Effects of CSE and LPS alone or in combination in ERK1/2, p38 and JNK activation. Serum-starved A549 cells were incubated with serum free medium alone (control, Ctrl), LPS 0.1 µg/ml, CSE 4% or CSE 4% associated with LPS 0.1 µg/ml for 5, 15, 30, 60 or 120 min. Total cell lysates were immunoblotted with antibodies specific for phospho-p38 kinase and total p38 kinase (A), phospho-JNK and total JNK (B) or phospho ERK1/2 and total ERK1/2 (C). A549 cells stimulated with IL-1 β (7 ng/ml) were used as positive controls. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure. 4. Effect of ERK 1/2, p38 and JNK inhibitor on chemokines release induce by CSE/LPS.

Serum-starved A549 cells were preincubated with serum-free medium alone (control: blank bars), vehicle (0.1% DMSO), the p38 MAPKinhibitor SB203580 (10 µM and 20 µM), the MEK1/2 inhibitor U0126 (3 µM and 5 µM) or the JNK inhibitor SP600125 (2 µM and 4 µM) for 2h and then stimulated with CSE (4%) together with LPS (0.1 µg/ml) for 24h (black bars).

At the end of the incubation period culture supernatants were collected for IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 quantification by ELISA. Data are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments; * $p < 0.05$ compared to control. β $p < 0.05$ compared to CSE/LPS.

Figure. 5. Effects of CSE and LPS alone or in combination on selected phosphoproteins in A549 cells. Cells were incubated for 40 min with serum-free medium alone (control), LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (A), CSE 4% (B), or CSE 4% and LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (C). Then cell extracts were probed on human phosphoprotein arrays. Results representing the signal intensity (AU) were expressed as % of the unstimulated control.

Figure.6. Effects of CSE and LPS alone or in combination on STAT3 phosphorylation in A549 cells. Serum-starved A549 cells were stimulated with serum free medium alone (control), LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$, CSE 4% or CSE 4% and LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ for 5, 15, 30 or 60 min. Total cell lysates were immunoblotted with antibodies specific for phospho STAT3 and total STAT3. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure.7 Roflumilast N-oxide associate with PGE₂ partly inhibits chemoamines release from A549 cells stimulated with CSE/LPS. Cells were preincubated with vehicle (blank bars) or 10 nM PGE₂ with roflumilast N-oxide at 1 nM (A, B and C) or 1 μM (D, E and F) (hatched bars) for 2 h and then stimulated or not with CSE at 2% or 4 % in combination with LPS at 0.1 $\mu\text{g/ml}$. After 24 hours cell culture supernatants were collected and chemokines were quantified by ELISA. Results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments * $p < 0.05$ compared to control (0.01% DMSO). # $p < 0.05$ compared to vehicle.

Figure. 8: Effects of roflumilast N-oxide on selected phosphoproteins in A549 cells. Cells were preincubated for 2h with vehicle (blank bars) or PGE₂ (10 nM) and roflumilast N-oxide (1 nM) (hatched bars) then co-stimulated with CSE (4%) and LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$). Cell extracts were probed on human phosphoprotein arrays. Results representing the signal intensity (AU) were expressed as % of the unstimulated control.

Chapitre 2

Évaluation des effets anti-
inflammatoires du Roflumilast N-oxide
sur des cellules épithéliales
pulmonaires exposées à l'élastase du
neutrophil

1. Contexte scientifique du travail

Comme nous l'avons vu précédemment, les neutrophiles sont les premières cellules à migrer vers les poumons après une exposition à la fumée de cigarette. Ces cellules sont capables de libérer des protéases. Parmi les différentes protéases libérées dans le milieu extracellulaire, la NE semble avoir un rôle majeur dans le processus inflammatoire de la BPCO. En effet, l'intervention pharmacologique avec des inhibiteurs de la NE montre une protection significative (approximativement 60% de réduction) contre les effets pro-inflammatoires et emphysémateux (Wright et al., 2002). Cette partie du travail a consisté à analyser les effets pro-inflammatoires de la NE sur des cellules épithéliales alvéolaires en culture (lignée A549), ainsi qu'à tester les effets du roflumilast N-oxide dans ce modèle. Dans un premier temps, nous avons mesuré les cytokines et chimiokines libérées après une stimulation par la NE, et dans un deuxième temps, nous avons exploré les voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la production de ces chimiokines.

Nous nous sommes enfin intéressés aux effets anti-inflammatoires du roflumilast N-oxide dans ces modèles *in vitro*. Nous avons étudié en comparaison, l'effet de la budesonide, un anti-inflammatoire stéroïdiens.

2. Résumé des principaux résultats

Nous avons observé une augmentation de la production d'IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 et Gro- α /CXCL1 quand les cellules étaient exposées à la NE à la concentration de 10 nM, pendant 30 min. En revanche, avec des concentrations supérieures à 10nM, nous avons une diminution de la libération de ces cytokines en raison d'un effet cytotoxique des hautes concentrations de la NE (Publication 2 figure 1A-D). La production de ces chimiokines induite par la NE fait intervenir la transcription du gène puisqu'un pic d'ARNm est observé à 2h mais pas à 4h (publication 2 figure 2A-D). Les effets synergiques du LPS ont aussi été étudiés dans ce modèle. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'effet additif sur la libération d'IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 et Gro- α /CXCL1 du LPS après une stimulation par le NE (Publication 2 Figure 3A-C).

Par la suite, nous avons étudié les différentes voies de signalisation qui pourraient être activées par la NE. La stimulation des cellules A549 par la NE induit une activation de

P38 après 5 min (Publication 2 Figure 4A). En revanche, nous n'avons pas observé d'activation par la NE des protéines ERK1/2, JNK ou STAT3 (Publication 2 Figure 4B-D).

Finalement, nous avons observé les effets du roflumilast N-oxide sur la libération de chimiokines induite par la NE. Le roflumilast N-oxide associé à la PGE₂ a été capable de diminuer la libération de l'IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 et Gro- α /CXCL-1 de façon dose dépendente. Nous avons aussi montré une diminution de la libération d'IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 avec la PGE₂ seule, mais les effets du Roflumilast N-oxide ont été supérieurs.

3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats, nous a permis de conclure que la stimulation par la NE peut conduire à la libération de chimiokines par des cellules épithéliales alvéolaires. De plus, la NE est capable d'activer la voie de signalisation p38 et le roflumilast N-oxide associé à la PGE₂ empêche la sécrétion de chimiokines induite par le NE. Cette étude met aussi en évidence que le LPS n'a pas d'effet sur l'augmentation de cytokines induites par la NE. Prises ensemble, ces données suggèrent que le CSE associé au LPS et NE n'induisent pas de voies de signalisation communes.

Publication 2

ROFLUMILAST N-OXIDE PREVENTS NEUTROPHIL ELASTASE-INDUCED CHEMOKINE PRODUCTION FROM EPITHELIAL CELLS

Tatiana Victoni¹, Florence Gleonnec¹, Hermann Tenor², Samuel Valença³,
Luis Cristovão Porto³, Vincent Lagente¹ and Elisabeth Boichot¹.

Address : ¹UMR991 INSERM/Université de Rennes 1, Rennes, France, ²Nycomed GmbH,
Konstanz, Germany, ³Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de
Janeiro Brasil.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory process in COPD is mainly represented by neutrophil chemotactism and activation. Neutrophil elastase (NE), an enzyme stored in the azurophilic granules of neutrophils. This enzyme is able to be release in the extracellular space following pulmonary cell activation and inflammatory process. It has been previously demonstrated that NE is able to induce IL-8/CXCL8 release from epithelial cells. The aim of this study is to investigate the effect of roflumilast n-oxide, a type 4 phosphodiesterase inhibiteur, on production of chemokines by A549 epithelial cells induced NE and to analyze the signaling pathways involved.

Methods: A549 cells were stimulated with NE alone (1-50nM) or associate with a low concentration of LPS (0.1 µg/ml) for 24h or 2 and 4 h for measurement of chemokine protein and mRNAs and 5-60 min for protein phosphorylation. Cells were also pre-incubated with Prostaglandin E₂ (10nM) alone or associate with RNO (1nM or 1µM before the addition of CSE/LPS. Production of IL-8/CXCL-8, CCL2/MCP-1 and Gro-α/CXCL1 were determined by ELISA and protein phosphorylation was observed by Western blotting.

Results: NE induced IL-8/CXCL-8, CCL2/MCP-1 and Gro-α/CXCL1 production by activating of p38 MAP Kinase, but don't required ERK1/2 and STAT activation. Moreover, of roflumilast N-oxide (RNO), the PDE4 inhibitor, associate with PGE₂ reduced NE-induced cytokine release.

Conclusions: In conclusion, we showed that NE is able to increase the release of chemokines from epithelial cells and that this effect is mediated by p38 MAP-kinase. However, we confirmed the anti-inflammatory activity of N-oxide Roflumilast and support it as a treatment of the inflammatory process in COPD.

Introduction

Proteases including metalloproteinases (MMPs) and elastase are very important player in a wide range of inflammatory diseases including chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Indeed, these enzymes are able to be release in the extracellular space following pulmonary cell activation and inflammatory process. These enzymes are also to degrade most of the component of the extracellular matrix leading to respiratory failure and emphysema. Therefore, proteases may provide opportunities for therapeutic intervention as selective target to reduce the degradation of the tissue and the inflammatory process.

Inflammatory process in COPD is mainly represented by neutrophil chimiotactism and activation. For example, in COPD, the number of neutrophils in bronchial tissue is correlated with the severity of airflow obstruction (1)

Neutrophil elastase (NE), an enzyme stored in the azurophilic granules of neutrophils, is an aggressive and cytotoxic 29-kDa serine protease (2). Extracellular NE activity is regulated by endogenous protease inhibitors including α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), secretory leukoprotease inhibitor, and α_2 -macroglobulin (3) When the extracellular free enzyme concentration exceeds the buffering capacity of endogenous inhibitors, NE becomes implicated in the signs, symptoms, and disease progression in inflammatory lung disorders via its role in the inflammatory process (4), mucus overproduction, (5) and lung tissue damage (6). In bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from patients with COPD, increased NE and reduced endogenous antiprotease levels are correlated with emphysema severity, with high levels of NE expressed in patients with rapidly declining lung function (7). In animal models, genetic deficiency or pharmacological intervention with small-molecule or physiological inhibitors of NE affords significant protection (approximately 60% reduction) against the proinflammatory and emphysematous effects of chronic cigarette smoke exposure (6). In addition, a broader role for NE modulating mucus hypersecretion and mucociliary clearance has been reported in

several in vitro and in vivo pharmacological studies(8) It has been previously demonstrated that NE is able to induce IL-8/CXCL8 release from epithelial cells showing an active cell-cell interactions in the microenvironment in airways during inflammatory process(9). The aim of this study is to investigate the effect of the incubation of A549 epithelial cells with NE on the production of chemokines and to analyse the signaling pathways involved. Furthermore, we also investigated the anti-inflammatory properties of the type 4 phosphodiesterase inhibiteur, roflumilast n-oxide on this in vitro model and compared with the corticosteroid, budesonide.

Materials and methods

Reagents Roflumilast-N-oxide (RNO) was provided by Nycomed (Konstanz, Germany). Human neutrophil elastase was obtained from Biocentrum (Krakow, Poland). F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification cell culture medium, antibiotics, glutamine, and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA). Lipolysaccharide from E. coli 055 :B5, Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) and IL-1 β recombinant and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The specific antibodies against phospho-(p44/42) ERK1/2, (p44/42) ERK1/2, phospho-p38 MAP kinase, p38 MAP kinase, phospho-SAPK/JNK, SAPK/JNK, were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Acrylamide, SDS, Tris, HEPES, and BSA were from Eurobio (Les Ulis, France). Bradford protein assay and Precision Plus Protein Dual Color Standards were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Cell culture. The human alveolar epithelial cell line (A549) was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in F-12K supplemented with 10% FCS, 1% antibiotics, 2mM L-glutamine, and 10 mM HEPES at 37°C and at 5% CO₂. 1x10⁵ cells were transferred to 24-well plates and grown to confluence for the experiments.

Cell culture and treatments A549 cells were washed and cultured for over-night in serum-free medium. The starved cells were incubated with neutrophils protease (NE) for 30 min then

washed with PBS and cultured in serum free F-12K for 2h or 4h by qPCR and 24h by cytokines measurement. Alternatively A549 cells were incubated with LPS (0.1 µg/ml) for 24h after NE incubation. Cells were also pre-incubated with PGE₂ (10 nM) alone or associated roflumilast n-oxide (RNO) at 0.1µM, 0.3µM and 1 µM and vehicle for 2h before the addition of NE. All experiments were performed in serum-free medium, triplicate and repeated at least 3 times. At the end of the incubation period culture supernatants were harvested and stored at -80°C until further analysis.

Measurement of chemokine protein and mRNAs. The concentrations of IL-8/CXCL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, Gro-α/CXCL1 in the culture supernatants were measured by ELISA from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom). Total RNAs were isolated from A549 cells using a commercially available kit (Promega, Madison, WI, USA). RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Total RNAs (1 µg) was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative RT-PCR was performed by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the StepOnePlusTM real-time PCR system (Applied Biosystems). Primer pairs for each transcript were chosen with NCBI software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. IL-8/CXCL8 primers forward 5'-AAG AAA CCA CCG GAA GGA AC-3', reverse 5'-AAA TTT GGG GTG GAA AGG TT-3'; MCP-1/CCL2 primers forward 5'-TGT CCC AAA GAA GCT GTG ATC-3', reverse 5'-ATT CTT GGG TTG TGG AGT GAG-3'; Gro-α/CXCL1 primers forward 5'-AAC CGA AGT CAT AGC CAC AC-3', reverse 5'-CCT CCC TTC TGG TCA GTT G3'; GAPDH primers forward 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3', reverse 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'). Amplification curves were read with the StepOne software V2.1 using the comparative cycle threshold

method. The relative quantification of the steady-state mRNA levels was normalized against GAPDH mRNA.

Evaluation of protein kinase phosphorylation by Western blotting. A549 cells were incubated with medium alone, vehicle and NE for 5, 15, 30, 60 and 120 min. Then, cells were washed with PBS and lysed with lysis buffer (Novagen, San Diego, CA, USA) containing 1% protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) for 15 min on ice. Equal amounts of cell lysate (40 µg) were separated by a 5% or 10% SDS-PAGE gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane, which was further incubated for 1 hour with 5% BSA or 5% w/v nonfat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 and then for 2h at room temperature with an antibody specific. After washing, the membranes were incubated for 2h with a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse/rabbit antibody. Blots were then incubated with an enhanced chemiluminescence solution for 1 min and exposed.

Viability assay by the tetrazolium salt method. Cytotoxicity of NE was tested on A549 cells was assessed by using the tetrazolium salt method (MTT) viability test. MTT was added to the culture medium at a final concentration of 0.5 mg/ml and incubated at 37°C for 2 h. The reaction product of MTT was extracted in dimethylsulfoxide (DMSO) and the OD was spectrophotometrically measured at 570 nm, with DMSO as a blank. Viability was expressed as percentage of the values (corresponding to 100%) of untreated cells.

Statistical analysis. The results are expressed as means \pm SEM. Analysis of treatment effects between groups was performed with a one-way ANOVA. Comparison of treatment interactions was done by tukey post test. For each analysis, *P* values less than 5% were considered statistically significant.

Results

Effect of NE on the production of IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2.

Incubation of A549 epithelial cells with NE (10 nM) elicited a significant increase in the release of IL-8/CXCL-8, MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 (Figure 1 A, B and C). Lower concentration (1 nM) of NE or upper concentrations (50 and 100 nM) were ineffective. It is possible that upper concentrations induced cell toxicity since we observed a reduction of cell viability under the presence of 50 and 100 nM of NE, which was significant at 100 nM (Figure 1D). We also investigated the effect of NE on mRNA expression for chemokines. NE (10 nM) elicited a significant increase in mRNA expression at 2h for IL-8/CXCL-8, MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 (Figure 2 A, C and E) but not at 4h (Figure 2 B, D and F). This confirmed the increased production of chemokines by NE from A549 epithelial cells.

Since most of cells are primed with LPS, we investigated the effect of the combination of NE (1nM to 50 nM) with an effective concentration of LPS (0.1 μ g/ml) when using alone. As you can see on figure 3, there was no difference whether NE was combined with LPS on the release of IL-8/CXCL-8, MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 (Figure 3 A, B and C).

Effects of NE on the activation of signaling pathways

We then investigated whether NE is able to activate several signaling pathways by using the western blot technique. Incubation of the cells with NE elicited the activation of phosphorylated P38 kinase at 5 min (Figure 4A) but not at 15, 30 and 60 min (Figure 4A). Moreover, there was no difference in the, JNK ERK 1/2 STAT3 phopho and total kinases whether the cells were stimulated or not with NE in comparison to control and vehicle (Figure 4 B, C, D).

Effects of roflumilast N-oxide on the release of IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 from A549 cells stimulated with NE. Cells were pre-incubated with PGE₂ 10 nM alone or associated with roflumilast N-oxide (0.1 μ M; 0.3 μ M and 1 μ M) or vehicle and Budesonide (1 μ M) for 2h and then stimulated with NE for 30min. After 24 hours cell culture supernatants were collected and chemokines were quantified by ELISA. PGE₂ elicited a significant inhibition of the release of IL-8/CXCL-8, MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 induced by NE on A549 cells (Figure 5 A, B and C). However, the addition of RNO (0.3 and 1 μ M) significantly reduced the production of MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 (Figure 5 A and B), but not of IL-8/CXCL8 (Figure 5C) as compared to PGE₂ alone. Budesonide (1 μ M) elicited a marked and significant inhibition of the production of IL-8/CXCL8, MCP1/CCL2 and Gro- α /CXCL1 (Figure 5, D, E and F).

Discussion

In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of PDE type 4 inhibitor, N-oxide roflumilast on alveolar epithelial cells stimulated by NE. We showed that NE is able to elicit the production of various chemokines from epithelial cells incubated with NE and that this effect is mediated by P38 MAP-kinase signaling pathway. Moreover the treatment of the cells with either RNO or budesonide significantly reduced the production of chemokines.

Numerous studies have reported that smokers, particularly those suffering of COPD, have higher levels of neutrophils which consequently induced a significant amount of elastase released into the extracellular medium (7). Several authors have also reported evidence that NE induced the release of chemokines by epithelial cells of the respiratory tract (10, 11). Thus, NE may potentiate the inflammatory process by interactions between neutrophils and epithelial cells by stimulating the release of chemokines. Indeed, we have shown that NE is capable of increasing the release of IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL2 and Gro/CXCL-1 and

mRNA expression by A549 cells. However, as showed previously and by us in this study , the release of chemokines induced by a low concentrations of NE (10 nM) and is reduced when the concentrations of the enzyme increase, probably due to the proteolytic effect of NE. Indeed, NE at 50nM elicited cell detachment of about 10%. In vivo, it is possible that the action of the enzyme is controlled by inhibitors such as α 1-proteinase, secretory leukoprotease inhibitor or elafin. But, in vitro, these inhibitors are absent and this probably would explain why NE is active at low concentrations and participate to the extension of inflammatory process. This has been shown in pulmonary secretions in COPD patients (7).

Walsh et al. (2001) have shown that the release of the IL-8/CXCL8 stimulated by NE in bronchial epithelial cell line could be prevented by specific inhibition of this enzyme, suggesting that the release of chemokines involves proteolytic activity of the NE and possibly via the activation of surface receptors. Different cell surface receptors could be involved in the release of chemokine. Dulon and colleagues reported that NE induced an inactivation of PAR-2 in two airway epithelial cell lines, A549 and 16HBE (12). Others studies have reported that NE induced the release and gene expression of IL-8/CXCL8 via TLR4 \rightarrow MyD88 iraq1 \rightarrow TRAF6 \rightarrow NF - kB (13). Studies on bronchial epithelial cells reported that the transcription of the gene for IL-8/CXCL8 and the release of the protein are dependent on a transient activation of EGF receptor (EGFR) (3). EGFR can be activated by two processes: the binding of a ligand to EGFR (for example, TGF- α , EGF) of EGFR activates the tyrosine kinase receptor and induces tyrosine phosphorylation (14,15). Alternatively EGFR may activate a mechanism independent of the ligand such as oxygen free radicals (16). Kohri et al. developed evidence that production of MUC5AC induced by NE occurs via the cleavage of pro-TGF- α and its binding to EGFR, but independently of oxidative stress (17).

It has been shown that NE may activate a MAP kinase namely ERK and p38. The increase in the expression of the gene coding for IL-8/CXCL8 induced by NE seems to

regulate NF- κ B, AP-1 and p38 transcription factors (10, 18). In addition, Sparkman and Boggaram reported that the stability of the IL-8/CXCL-8 mRNA was increased by p38 activation (19). On the other hand, Yu and colleagues showed that p38 induces the synthesis of IL-8/CXCL-8 by regulation of translation rather than by stabilization of the transcript. Thus, several mechanisms regulate the production of IL-8/CXCL-8. Our results clearly showed an activation of phosphorylated p38 by NE. These are in agreement with others works. who showed that A549 cells stimulated with NE induced the increase in production of IL-8/CXCL-8 through the p38 signaling pathway. It has been previously reported that Stat3 may play a role in the inflammatory process in airways (20). However, in contrast to that it has been observed after stimulation of the epithelial cells with cigarette smoke extract (CSE) (Victoni et al., 2013), we did not observe any activation of Stat 3 by NE.

Phosphodiesterase 4 inhibitors appear to be new therapeutic agents capable of suppressing the inflammatory response in COPD. However, the effect of this compound on the NE-induced release of chemokines has not yet been described. We investigated the effect of RNO, on the stimulation of A549 cells by NE. We clearly showed that RNO is able to reduce the NE-induced production of chemokines. However, this inhibition is observed in the presence of PGE₂. Indeed, PGE₂ stimulates the increase in intracellular cAMP which was then degraded by phosphodiesterase type 4. This indicates that A549 epithelial cells are poor in cAMP and therefore PDE4 inhibitors are not active in the absence of PGE₂ and intracellular cAMP.

In conclusion, we showed that NE is able to increase the release of chemokines from epithelial cells induced by NE and that this effect is mediated by p38 MAP-kinase. However, we confirmed the anti-inflammatory activity of N-oxide Roflumilast and support it as a treatment of the inflammatory process in COPD.

Acknowledgments:

This study was supported INSERM. The authors M.L., T.V., V.L., L.C.P., and S.S.V. are grateful to the CAPES–COFECUB for funding and bilateral agreement (Brazil–France).

Reference

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350(26):2645-2653.
2. Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(8):2228-2232.
3. Rubin H. Serine protease inhibitors (serpins): Where mechanism meets medicine. *Nat Med* 1996;2(6):632-633.
4. Bergin DA, Greene CM, Sterchi EE, Kenna C, Geraghty P, Belaaouaj A, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG. Activation of the epidermal growth factor receptor (egfr) by a novel metalloprotease pathway. *J Biol Chem* 2008;283(46):31736-31744.
5. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial na⁺ channels and increases airway epithelial na⁺ transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(5):L813-819.
6. Wright JL, Farmer SG, Churg A. Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(7):954-960.
7. Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y. [neutrophil elastase and elastin-derived peptides in bal fluid and emphysematous changes on ct scans]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1996;34 Suppl:69-74.
8. Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. Neutrophil elastase increases muc5ac mrna and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):L835-843.
9. Kitagawa D, Tanemura S, Ohata S, Shimizu N, Seo J, Nishitai G, Watanabe T, Nakagawa K, Kishimoto H, Wada T, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J Biol Chem* 2002;277(1):366-371.
10. Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Singh IS, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. Neutrophil elastase induces il-8 gene transcription and protein release through p38/nf- κ b activation via egfr transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(3):L407-416.
11. Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, Tetley TD. Primary human alveolar type ii epithelial cell chemokine release: Effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(4):500-509.
12. Dulon S, Cande C, Bunnett NW, Hollenberg MD, Chignard M, Pidard D. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: Disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(3):339-346.
13. Walsh DE, Greene CM, Carroll TP, Taggart CC, Gallagher PM, O'Neill SJ, McElvaney NG. Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by myd88/irak/traf-6 in human bronchial epithelium. *J Biol Chem* 2001;276(38):35494-35499.

14. Reynolds FH, Jr., Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR. Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of egf receptors. *Nature* 1981;292(5820):259-262.
15. Hunter T, Cooper JA. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in a431 human tumor cells. *Cell* 1981;24(3):741-752.
16. Goldkorn T, Balaban N, Matsukuma K, Chea V, Gould R, Last J, Chan C, Chavez C. Egf-receptor phosphorylation and signaling are targeted by h2o2 redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19(5):786-798.
17. Kohri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(3):L531-540.
18. Chen HC, Lin HC, Liu CY, Wang CH, Hwang T, Huang TT, Lin CH, Kuo HP. Neutrophil elastase induces il-8 synthesis by lung epithelial cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biomed Sci* 2004;11(1):49-58.
19. Sparkman L, Boggaram V. Nitric oxide increases il-8 gene transcription and mrna stability to enhance il-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(4):L764-773.
20. Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao HT, Ng HT, Sung YJ. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated apoptosis is involved in outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells in a model of human trophoblast-endometrial interactions. *Biol Reprod* 2003;69(5):1515-1524.

Figure 1

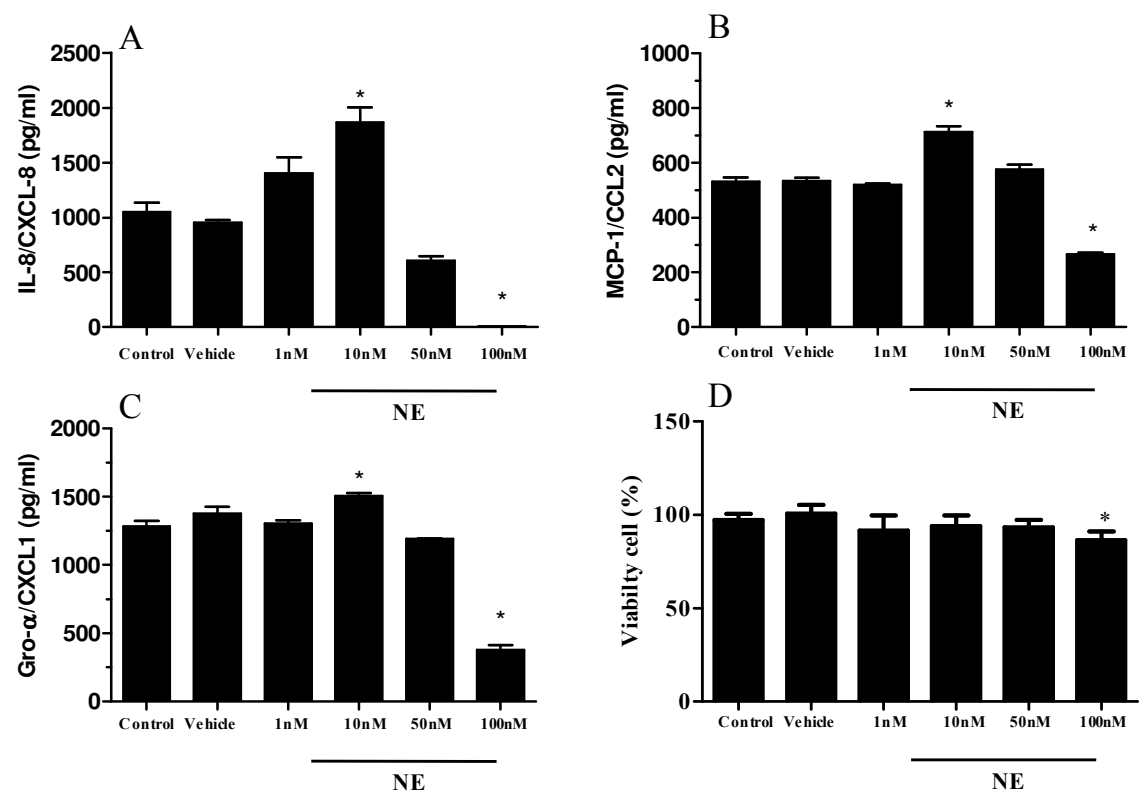


Figure 2

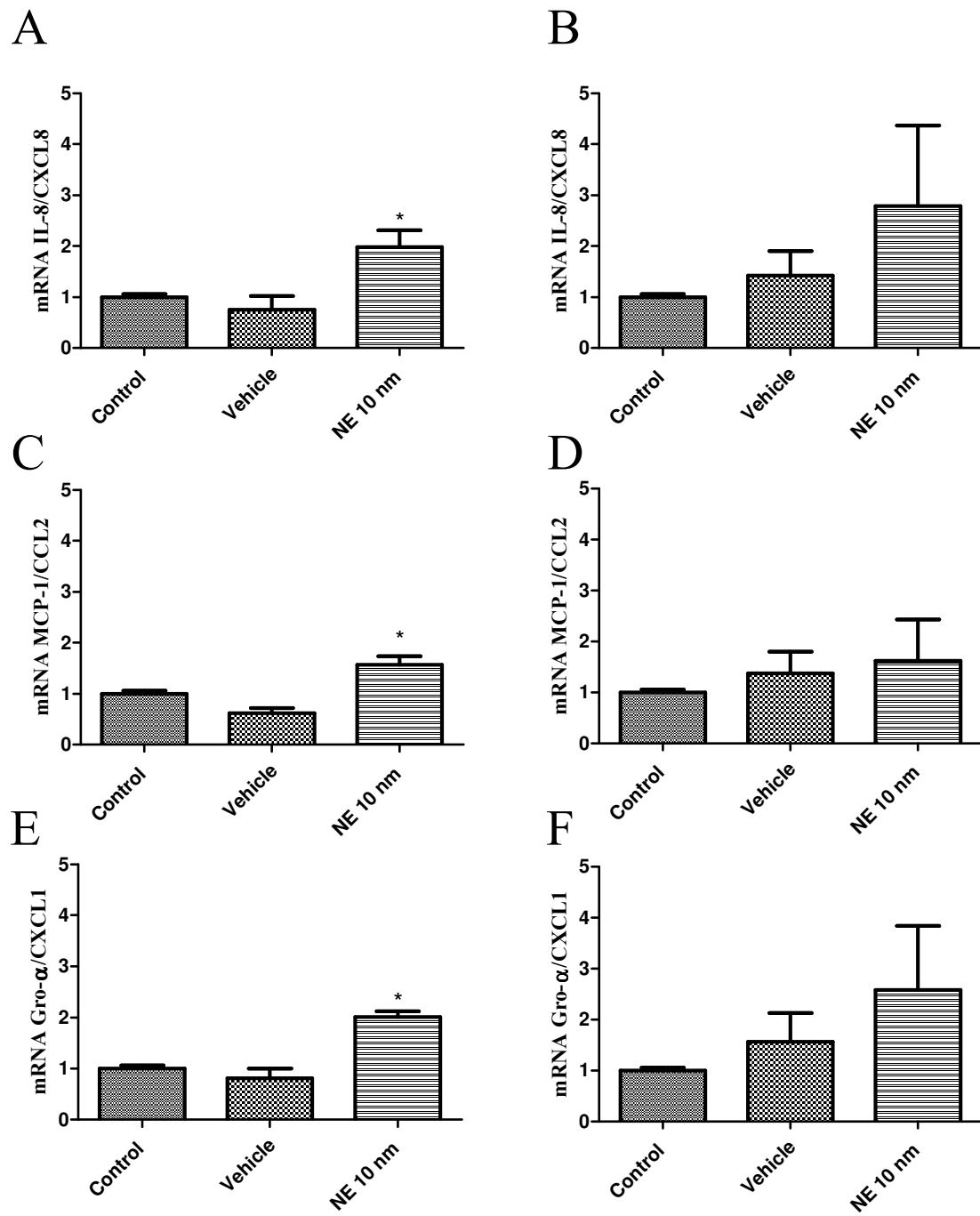


Figure 3

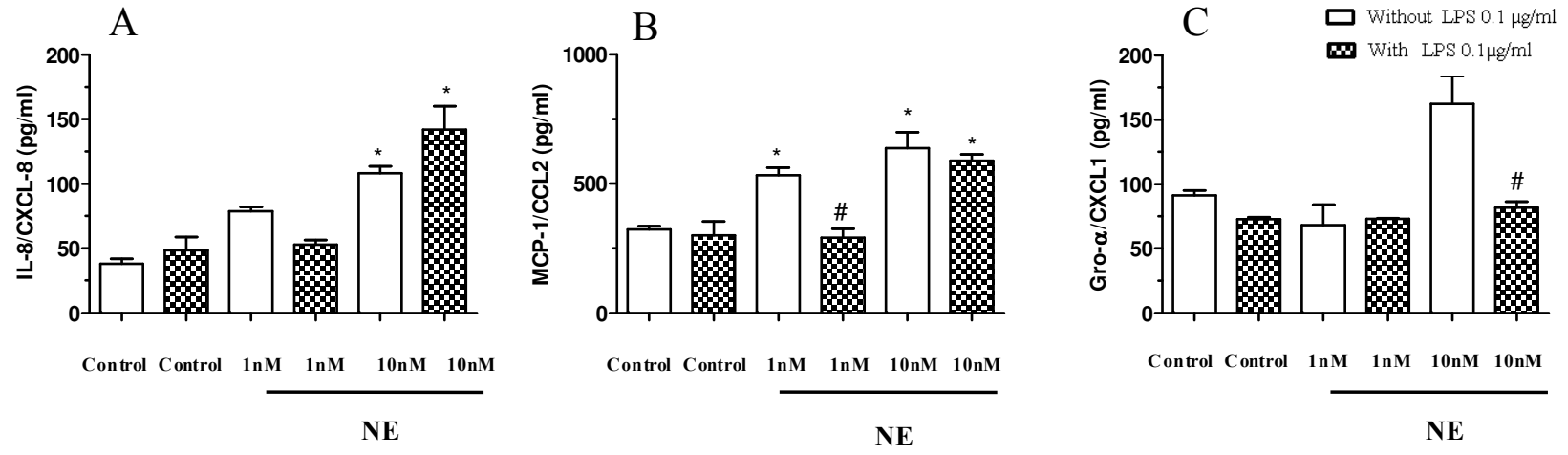


Figure 4

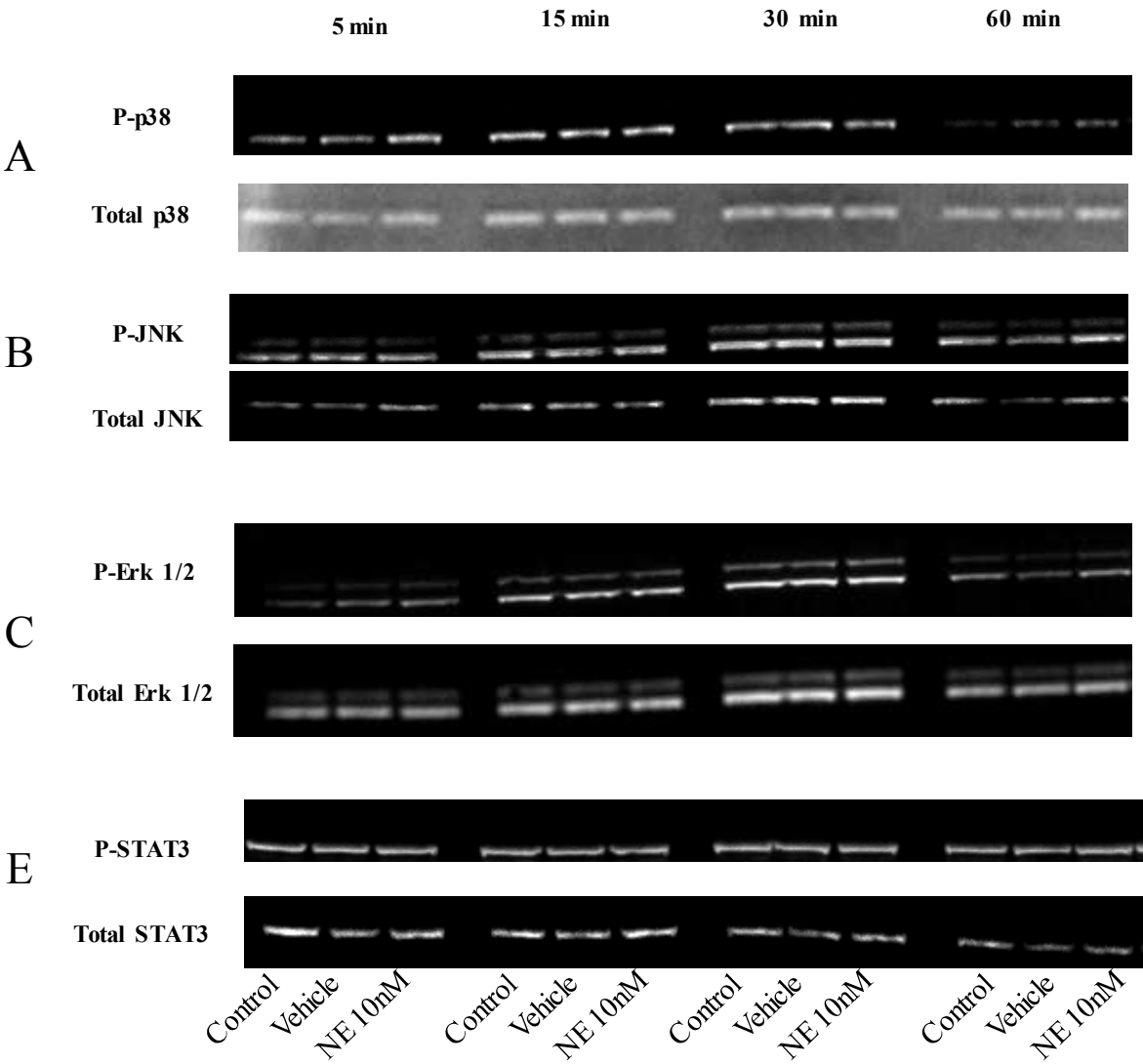
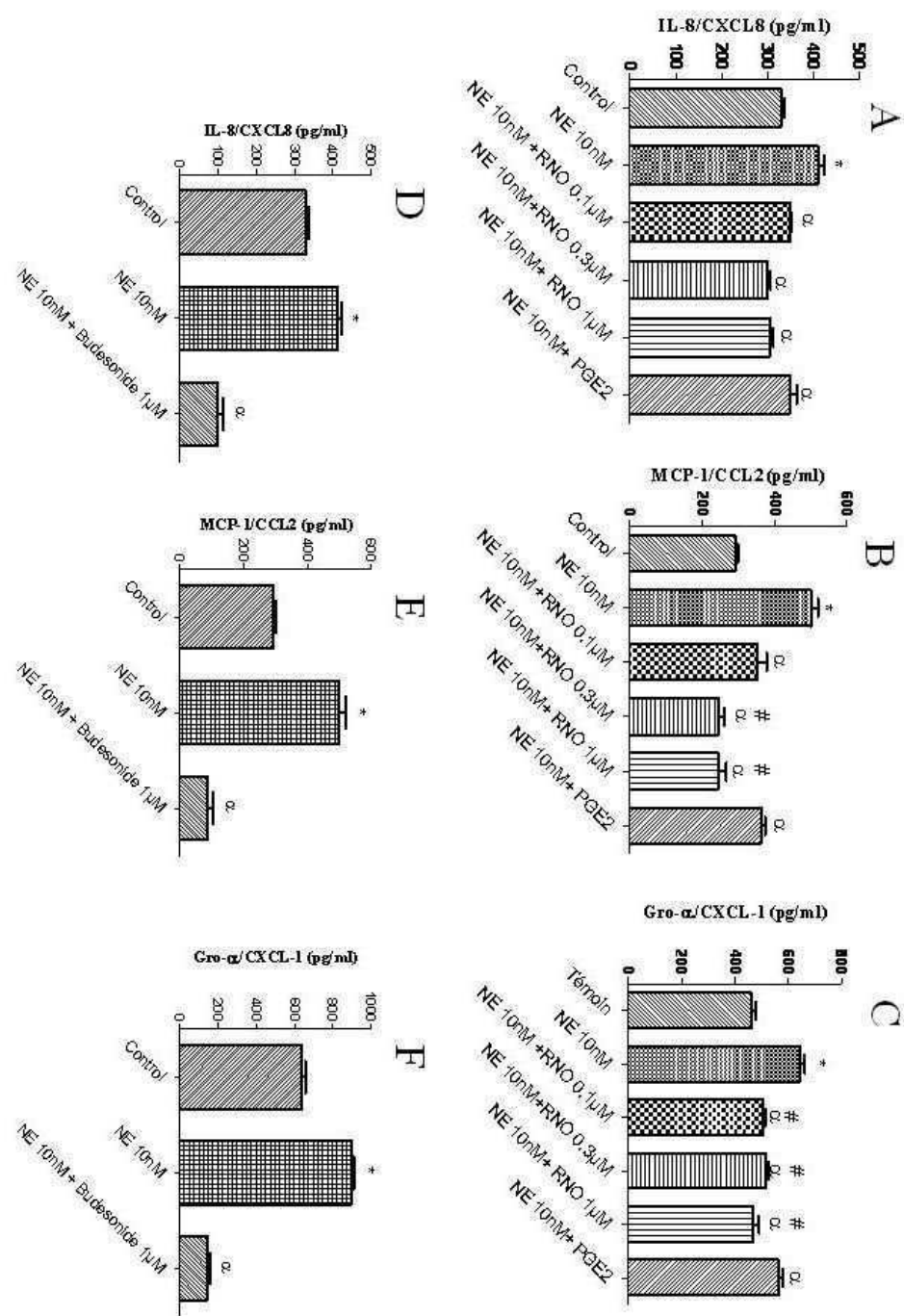


Figure 5



Figures legends

Figure 1. Effect of NE on IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 release and cell viability (MTT test). Serum-starved A549 cells were incubated with medium alone (control), vehicle and different concentration of NE (0.1 nM-100 nM) for 30 min then incubated with medium alone for 24h. The culture supernatants were collected and the concentrations of chemokines were measured by ELISA (A, B, and C) and viability was determined by MTT test (D). The data represent the mean \pm SEM of 6 experiments. * $p < 0.05$ compared to control.

Figure 2. Effects of NE on IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 mRNA expression. Serum-starved A549 cells were incubated with medium alone (control), vehicle and NE (10 nM) for 30 min and then incubated with medium alone for 2h (A, C and E) and 4h (B, D and E). mRNA expression was determined by real-time quantitative RT-PCR. The results are normalized to the gene expression of GAPDH. The data represent the mean \pm SEM of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared to control

Figure 3. Effects of combination of LPS NE induced IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 from A549 cells. Serum-starved A549 cells were incubated with medium (control), vehicle and NE (0.1nM-100 nM) for 30min, and then incubated with medium alone (blank bars) or LPS 0,1 μ g/ml (hatched bars) for 24 h. The culture supernatants were collected and the concentrations of chemokines were measured by ELISA. The data represent the mean \pm SEM of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared to control, α $p < 0.05$ compared to LPS 0,1 μ g/ml.

Figure 4. Effects of NE on phosphorylated and total ERK1/2, p38 kinase and JNK in A549 cells Serum-starved A549 cells were incubated with serum free medium alone (control), vehicle and NE 10nM for 5, 15, 30, 60 or 120 min. Total cell lysates were immunoblotted with antibodies specific for phospho-p38 kinase and total p38 kinase (A), phospho-JNK and total JNK (B) or phospho ERK1/2 and total ERK1/2 (C). A549 cells stimulated with IL-1 β (7 ng/ml) were used as positive controls.

Figure.5 Effects of roflumilast N-oxide associate with PGE₂ on IL-8/CXCL8, Gro- α /CXCL1 and MCP-1/CCL2 release from A549 cells stimulated NE. Cells were pre-incubated with PGE₂ 10 nM alone or associated with roflumilast N-oxide (0.1 μ M; 0.3 μ M and 1 μ M) or vehicle and Budesonide (1 μ M) for 2h and then stimulated with NE for 30min. After 24 hours cell culture supernatants were collected and chemokines were quantified by ELISA. Results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control. α $p < 0.05$ compared to NE 10nM group. #. $p < 0.05$ compared to PGE.

Discussion

IV-DISCUSSION

Les cellules épithéliales sont les premières cellules du poumon à être exposées aux constituants de l'air inhalé et par conséquent à la fumée de cigarette et aux pathogènes potentiels. Dans la première partie de ce travail, nous avons développé un modèle *in vitro* d'activation cellulaire par un extrait de fumée de cigarette associé au LPS.

- *Effets du CSE et LPS seul ou en combinaison sur les cellules épithélial.*

Nous avons débuté notre étude avec une lignée de cellules épithéliales alvéolaires (A549). Ces cellules sont connues pour libérer des chimiokines telles que l'IL-8/CXCL8, le MCP-1/CCL2 et le Gro- α /CXCL-1 en réponse à divers stimuli (Becker et al., 1994; Mio et al., 1997; Standiford et al., 1991). Ces chimiokines ont un fort pouvoir chimiotactique envers les neutrophiles, les macrophages et les monocytes, des cellules inflammatoires majoritairement recrutées dans les voies aériennes de patients atteints de BPCO. De plus, elles sont retrouvées en grande quantité dans les LBA et expectorations de ces patients (Capelli et al., 1999; Keatings and Barnes, 1997). Nous avons décidé d'évaluer dans un premier temps la libération de ces chimiokines par les cellules épithéliales stimulées par du CSE seul.

Nos résultats montrent que le CSE n'entraîne pas d'augmentation significative des taux d'IL-8/CXCL8 et de Gro- α /CXCL-1. En revanche, nous avons observé une augmentation de la libération de MCP-1/CCL2. Nos résultats confirment ainsi les études de Kode *et al.* et Moodie *et al.* qui n'observent pas de différence significative dans la libération d'IL-8/CXCL8 après exposition au CSE (1% ; 2,5% ; 5%) (Kode et al., 2006; MacRedmond et al., 2007; Moodie et al., 2004). Cependant, certaines études rapportent une augmentation de production d'IL-8/CXCL8 par les cellules A549 après une exposition à la fumée de cigarette (MacRedmond et al., 2007; Masubuchi et al., 1998). Les conditions de culture et le nombre de passage des cellules utilisées pourraient expliquer cette différence. En revanche, peu d'études portent sur l'effet du CSE dans la libération de Gro- α /CXCL1 et MCP-1/CCL2 par les A549.

Des épisodes de surinfection, souvent d'origine bactérienne, peuvent contribuer à l'aggravation progressive de la BPCO. Selon certaines hypothèses, ces épisodes représenteraient la première cause d'exacerbation de cette maladie. Sur cette base, nous nous sommes penchés sur les événements précoces du développement de la BPCO associés à une infection bactérienne récurrente.

La stimulation des cellules A549 par des concentrations élevées de LPS augmente la libération d'IL-8/CXCL8, mais une concentration de 0,1 µg/ml de LPS n'augmentent pas significativement la quantité d'IL-8/CXCL8 libérée (Publication 1 Figure 1D). Cependant, la stimulation combinée du LPS 0,1 µg/ml avec du CSE pendant 24 heures entraîne une augmentation significative de la quantité d'IL-8/CXCL8, Gro-α/CXCL1 et MCP1/CCL2 (Figure 21 B et C). Ces résultats corroborent ceux de Pace *et al.* qui montrent une augmentation d'IL-8/CXCL8 avec du CSE 10% combiné à du LPS à la concentration de 1 µg/ml sur des cellules épithéliales bronchiques 16-HBE (Pace et al., 2008). Ceci contraste avec les études de Witherden *et al.* qui mettent en évidence une diminution des niveaux d'IL-8/CXCL8, de Gro-α/CXCL1 et de MCP-1/CCL2 par les cellules épithéliales stimulées ou non par le LPS (10 µg/ml) après exposition au CSE. Dans cette étude, des cellules épithéliales alvéolaires de type II provenant d'un carcinome pulmonaire ont été utilisées en culture primaire (Witherden et al., 2004). Nous avons également observé une diminution de la libération du Gro-α/CXCL1 (basale ou après stimulation par du LPS 0,1 µg/ml) après l'exposition au CSE dans une culture primaire de cellules épithéliales bronchiques provenant d'un patient atteint de BPCO. En revanche, nous avons montré une augmentation de la libération d'IL-8/CXCL8 sans observer de variation du taux de MCP-1/CCL2 sur ces cellules exposées au CSE. Cette disparité peut résulter d'une réponse distincte entre l'épithélium alvéolaire et l'épithélium des voies respiratoires de conduction, mais aussi de la provenance des cellules de carcinome. Alternativement, les divergences entre les études peuvent aussi s'expliquer par les différences de concentrations de CSE et LPS utilisées. Witherden *et al.* ont utilisé des concentrations de CSE et LPS environ 10 fois supérieures aux nôtres. Cependant, il est difficile de relier les concentrations de CSE utilisées *in vitro* avec celles *in vivo*.

Plusieurs études ont montré que le CSE peut inhiber la production basale ou induite par le LPS de cytokines par les lignées cellulaires et par les cellules en culture primaire (Laan et al., 2004; MacRedmond et al., 2007; Moodie et al., 2004; Witherden et al., 2004). Cependant, les concentrations de LPS utilisées dans ces études sont de 10 à 100 fois plus élevées que la concentration utilisée dans notre étude (0,1 µg/ml). Chez des volontaires sains, l'inhalation de LPS à 5-50 µg/ml provoque une inflammation caractérisée par un recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires (Korsgren et al., 2011). De plus, la concentration de LPS dans le LBA chez les patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë est de 1-1,585 pg/ml (Martin et al., 1994). Les doses de LPS de 1 µg/ml et 10 µg/ml utilisées dans ces études semblent donc extrêmement élevées pour des expériences *in vitro*. De plus,

l'exposition de cellules épithéliales au CSE associé au LPS à la concentration de 1 µg/ml n'a pas d'effet sur la libération des IL-8/CXCL-8 dans notre modèle.

Cet effet « anti-inflammatoire » du CSE observé par certains auteurs semble s'opposer à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et également au recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons des patients atteints de BPCO. De plus, il existe une corrélation entre la colonisation bactérienne, l'augmentation des marqueurs de l'inflammation dans les expectorations et la fréquence des exacerbations (Patel et al., 2002; Stockley et al., 2000).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer les exacerbations de la BPCO lors d'infections bactériennes récurrentes. Ainsi, certains auteurs soumettent l'hypothèse qu'une exposition prolongée à de faibles doses de LPS présent dans la fumée de cigarette peut conduire à une tolérance au LPS et induire un risque d'infection bactérienne. Depuis 1999, certains travaux ont montré que le LPS ou d'autres contaminants bactériens sont présents dans la fumée de cigarette (Hasday et al., 1999; Pauly et al., 2010; Sapkota et al., 2010). Dans cette optique, nous avons analysé la présence de LPS dans notre solution de CSE à 100%. Nous y avons constaté de faibles concentrations de LPS (inférieures à 100 pg/ml). Bien que la fumée de cigarette contienne des molécules bioactives de LPS (Hasday et al., 1999), nous n'attribuons pas les effets de libération de cytokines à la présence d'endotoxine dans la fumée. Nous proposons comme hypothèse que la fumée de cigarette altère la réponse innée du poumon, entraînant une réponse inflammatoire accrue aux infections bactériennes, se caractérisant par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Celles-ci jouent un rôle crucial dans la progression de la BPCO, contribuant au déclin des fonctions respiratoires connues comme l'hypothèse du cercle vicieux (Sethi and Murphy, 2008).

L'augmentation de la libération de chimiokines à partir de cellules A549 stimulées par la combinaison CSE/LPS n'a pas été associée à une modification significative d'expression d'ARNm. Ces observations peuvent nous indiquer que l'ARNm constitutif est suffisant pour provoquer l'expression de chimiokines. Mais si tel n'est pas le cas, nous pouvons supposer également une évolution temporelle des taux d'ARNm décalée par rapport à l'expression des protéines. Cette augmentation de l'ARNm, si elle existe, pourrait se produire avant 4h.

- *Les voies de signalisation impliquées lors de l'exposition au CSE/LPS*

La capacité des cellules à libérer des cytokines résulte d'une cascade d'événements qui est en partie amorcée par des voies de signalisation, notamment par la voie des MAP kinases. Les MAP kinases sont activées par des stimuli variés, dont fumée de la cigarette. Aussi, nous avons examiné par western blotting la phosphorylation de la MAP kinase p38, JNK, et ERK1/2 en réponse au CSE/LPS. Bien que la libération d'IL-8/CXCL8, de MCP-1/CCL2 et de Gro- α /CXCL1 apparaisse dépendante de JNK et de p38 dans plusieurs modèles expérimentaux (Bhattacharyya et al., 2010; Ip et al., 2006; Issa et al., 2006), nous avons montré à l'aide d'inhibiteurs ou par observation directe que la libération de MCP-1/CCL2 et de Gro- α /CXCL1 par les cellules A549 stimulées par le CSE/LPS est indépendante de JNK et p38. Nous avons cependant observé une diminution de la libération d'IL-8/CXCL8 après incubation avec l'inhibiteur de JNK, SP600125 à 4 μ M. Nous supposons que cette concentration d'inhibiteur peut aussi exercer un effet inhibiteur sur d'autres kinases comme ERK1/2. En effet, l'U0126, un inhibiteur de la voie ERK1/2, utilisé à des concentrations de 3 et 5 μ M, diminue la libération d'IL-8/CXCL8 et de Gro- α /CXCL1 induite par du CSE/LPS par les cellules A549, indiquant que la voie ERK1/2 est impliquée dans la production de ces chimiokines. Nous avons également détecté une phosphorylation d'ERK1/2 par western blotting. Ces résultats sont en accord avec Chang *et al.*, qui ont montré une activation de ERK1/2 dans des cellules épithéliales exposées à la fumée de cigarette (Chang et al., 2001). De plus, une augmentation significative de la forme activée d'ERK1/2 a été retrouvée dans les voies respiratoires et dans les cellules épithéliales alvéolaires des patients atteints d'emphysème, par rapport aux témoins non-emphysémateux (Mercer et al., 2004). D'autre part, l'inhibiteur d'ERK 1/2 n'a pas réussi à réduire la libération de MCP-1/CCL2

Cette observation suggère que d'autres voies de signalisation peuvent également contribuer à la génération de ces chimiokines. Pour tenter de les identifier, nous avons utilisé une membrane à protéines. Celle-ci permet de caractériser 47 phospho-kinases différentes. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence que la voie JAK/STAT est fortement stimulée après l'exposition à la combinaison CSE/LPS en comparaison aux témoins non exposés ou exposés au LPS 0,1 μ g/ml. En effet, les taux de 13 MAP kinase, dont 8 sont impliquées dans la voie JAK/STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT5ab et STAT6) étaient augmentés après une exposition de 40 minutes au CSE/LPS. En revanche, seuls les taux de 6 phospho-kinases étaient augmentés avec le CSE 4% et 9 avec le

LPS 0,1 µg/ml. Il est important de souligner que l'intensité de l'expression après l'exposition au CSE ou au LPS 0,1 µg/ml est largement inférieure à l'expression observée après une exposition au CSE combiné au LPS. Ces résultats suggèrent qu'en plus de la voie ERK1/2, la voie JAK/STAT est impliquée dans la libération de chimiokines induite par le CSE/LPS. En effet, il a été décrit que les récepteurs couplés aux tyrosines kinases tels que JAK sont impliqués dans la production de cytokines ou de chimiokines (Biswas and Sodhi, 2002; Choi et al., 2012). Les résultats des puces à protéines ont été confirmés par western blotting et notre analyse a porté sur STAT3 car cette molécule de signalisation est souvent impliquée dans l'activation d'ERK1/2 et de la famille Src (Ovrevik et al., 2004; Scaltriti and Baselga, 2006), deux voies de signalisation activées par l'exposition au CSE/LPS. Goyal *et al.*, (2010) ont démontré que des fragments de *E. coli* induisaient la sécrétion d'IL-8/CXCL-8 par l'activation de STAT3 et de ERK1/2 dans une lignée de cellules épithéliales intestinales (Goyal et al., 2010). Par ailleurs, STAT3 peut être activée indépendamment de JAK, notamment par les Src kinases (Scaltriti and Baselga, 2006). Dans de nombreux cas, une activation alternative de STAT est sous la dépendance d'autres tyrosine-kinases. Dans différents types de cancers, comme le cancer colique, il a été observé une augmentation de l'expression de Src accompagnée d'une surexpression d'EGFR, suggérant une forte interaction entre les protéines STAT et celles de la famille des Src. Une hypothèse d'activation de STAT3 par les Src pourrait expliquer la phosphorylation tardive de STAT3 observée par western blotting à 60 minutes en plus de celle observée à 15 minutes. En effet, nous avons mesuré une augmentation des 5 Src kinases (Src, Lyn, Fgr, Fyn et Yes) après 40 minutes d'exposition avec du CSE/LPS qui pourrait être responsable de l'activation de STAT3 à 60 minutes.

De même, les Src kinases ont été identifiées comme activatrices des MAP kinases en réponse à divers stimuli (Kitagawa et al., 2002; Liu et al., 2001). Cette hypothèse est soutenue par Ovrevik et al, qui suggèrent que l'activation de ERK1/2 est dépendante des Src kinases et qu'elle est responsable d'une augmentation de la libération d'IL-8/CXCL8 par les cellules A549 stimulées par la silice (Ovrevik et al., 2004). Dans notre étude, l'activation d'ERK1/2, mesurée après 60 minutes par western blotting, par des kinases Src est une hypothèse plausible. Suivant ce raisonnement, le faible niveau d'activation d'ERK1/2 observé par western blotting, mais l'effet important de son inhibiteur sur la libération de cytokines pourraient être dus au retard (plus de 120 min) d'activation d'ERK1/2 dépendant d'abord de l'activation de la famille des Src et de STAT3 par du CSE/LPS.

Nous avons également observé l'activation du facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein), suggérant l'implication de l'AMPC dans ce modèle. Ce résultat est en accord avec l'étude de Sun et al., montrant que CREB régule l'expression du gène de la chimiokine CXCL8 dans les cellules A549 (Sun et al., 2008).

Les cascades de transduction de signaux sont généralement initiées par divers stimuli qui activent les récepteurs transmembranaires. Le rôle précis de la fumée de cigarette n'est pas encore clairement identifié, mais elle pourrait altérer les interactions ligand-récepteur ou entraîner une activation directe des récepteurs membranaires.

Depuis quelques années, la recherche de nouveaux récepteurs impliqués dans la BPCO se tourne vers les récepteurs TLRs et plus particulièrement le TLR4. En effet, les TLR4 sont impliqués dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette (Doz et al., 2008). Ce dernier est connu comme étant le récepteur du LPS. Nos résultats montrent que la libération d'IL-8/CXCL8 est dépendante du TLR4, à l'inverse de celle de la MCP-1/CCL2 et du Gro- α /CXCL-1. Pace et ses collaborateurs ont mis en évidence à l'aide d'anticorps anti TLR4, l'implication de ce récepteur dans la libération d'IL-8/CXCL8 induite par la fumée de cigarette en utilisant des cellules épithéliales (Pace et al., 2008). Il semble que la libération d'IL-8/CXCL8 par la fumée de cigarette soit dépendante du TLR4, mais la fumée de cigarette activerait non seulement ce récepteur, mais aussi d'autres récepteurs comme par exemple l'EGFR et les récepteurs nicotiniques, qui sont responsables de la libération d'autres cytokines. Certains auteurs suggèrent aussi une altération de l'expression du TLR4 par le CSE. Cette diminution de l'expression du TLR4 à la surface cellulaire peut s'expliquer par l'internalisation de ce récepteur (Sarir et al., 2009). De plus, l'expression du TLR4 semble être diminuée dans les macrophages exposés à la fumée de cigarette. En revanche d'autres auteurs ont montré que des cellules issues de lavage broncho alvéolaire (LBA) de patients atteints de BPCO présentent une augmentation de l'expression du TLR4 (Pace et al., 2008).

Plusieurs équipes ont montré une phosphorylation directe de l'EGFR par la fumée de tabac, ce qui va dans le sens de notre hypothèse. Ces travaux ont montré une activation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'EGFR par la fumée de cigarette dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques (NCI-H292) qui expriment de manière constitutive l'EGFR. Ces résultats montrent l'implication de l'EGFR dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-8/CXCL8 en réponse à la fumée de cigarette par activation d'ERK1/2 (Richter et al., 2002). En 2004, Gensch et al., ont montré que l'activité EGFR est

nécessaire à l'induction de MUC5AC par la fumée (Gensch et al., 2004). Ces travaux ont montré que la fumée de cigarette et les espèces réactives de l'oxygène induisent l'expression des gènes *MUC5AC* à la fois par un mécanisme indépendant de l'EGFR, dans lequel les espèces réactives de l'oxygène traversent la membrane pour activer des protéines JNK mais également *via* une voie dépendante de l'EGFR qui active ERK1/2. Il est aussi important de rappeler que la signalisation par l'EGFR est souvent impliquée dans l'activation d'ERK1/2, Src et STAT3 qui sont activées par du CSE/LPS.

L'acroléine est un composé du tabac qui contribue également à la phosphorylation d'EGFR, et par conséquent à une activation d'ERK1/2 dans des cellules épithéliales (Deshmukh et al., 2008). Un travail récent a montré que l'acroléine et le CSE stabilisent l'ARNm de l'IL-8/CXCL8 par l'activation de la voie p38 dans les cellules musculaires lisses bronchiques (Moretto et al., 2012). Ces auteurs suggèrent que la signalisation de la voie p38 est un mécanisme important de la régulation post-transcriptionnelle conduisant à la hausse du niveau de l'ARNm d'IL-8/CXCL-8 induite par le CSE et l'acroléine.

Un autre composé du tabac est la nicotine. Il a été démontré à partir de cultures de cellules épithéliales pulmonaires que la nicotine pouvait activer la voie de signalisation ERK1/2 (Tsai et al., 2006). Dans des cultures de cellules pulmonaires cancéreuses, la nicotine n'a pas d'effet sur les voies de signalisation JNK et p38, mais elle semble activer ERK1/2 (Heusch and Maneckjee, 1998). D'autres travaux ont démontré que la nicotine et le CSE ont la capacité de phosphoryler STAT-3 *via* les récepteurs $\alpha 7$ nicotiniques (nAChR) dans les macrophages et les kératinocytes oraux (Arredondo et al., 2006; de Jonge et al., 2005). En effet, le facteur de transcription STAT3 est phosphorylé et recruté après activation des récepteurs $\alpha 7$ nicotiniques (nAChR), elle-même dépendante de l'activation de JAK-2 par la nicotine. De plus, il semble que, sur des kératinocytes oraux, la nicotine active la voie Ras/Raf-1/MEK1/ERK conduisant à une augmentation de l'expression du gène codant pour STAT3, ce qui amène à proposer d'autres voies complémentaires pouvant activer STAT3 (Arredondo et al., 2006). Par opposition à nos observations sur les cellules épithéliales exposées au CSE/LPS, Jonge et al. ont mis en évidence dans des macrophages péritonéaux une diminution par la nicotine de la libération de TNF- α , de MIP-2 et d'IL-6 induite par le LPS *via* STAT3 (de Jonge et al., 2005). L'effet anti-inflammatoire de la nicotine a été également identifié dans des macrophages alvéolaires (Matsunaga et al., 2001).

- *Effets du LPS et du CSE sur les macrophages et comparaison avec les cellules épithéliales*

Dans notre étude, nous avons aussi observé une forte diminution des niveaux d'IL-6 induits par le LPS après l'exposition des macrophages au CSE. Nos résultats sont en accord avec Birrell et al., puisque leurs travaux ont montré une diminution de l'expression des ARNm du TNF- α , du Gro- α /CXCL1, d'IL-1 β et du MIP-1 α induits par le LPS (0,1 μ g/ml) sur des macrophages après exposition au CSE 2,5% et 5 %. En revanche, nous n'avons pas vu de changement du niveau d'IL-8/CXCL8 basal ou induits par le LPS, après l'exposition au CSE. Ces résultats contredisent d'autres études qui montrent une augmentation de l'expression d'IL-8/CXCL8 par les macrophages et monocytes exposés au CSE ou un effet additif du CSE sur la libération d'IL-8/CXCL8 induite par le LPS (Birrell et al., 2008; Facchinetti et al., 2007). Ces derniers ont également montré que les inhibiteurs de MAP kinases sont responsables de la diminution d'IL-8/CXCL8 induite par du CSE/LPS sur une lignée de monocytes (THP-1). Bien que nous ayons une diminution d'IL-1 β induite par le LPS avec le CSE 4%, elle n'est pas significative comme l'ont montré Birrell et ses collaborateurs.

Comme nous l'avons vu, les macrophages et les cellules épithéliales répondent différemment à l'exposition au CSE/LPS. Ces mêmes observations ont été faites par Thorley et al., en réponse au LPS seul. Dans cette étude, le LPS induit la libération de Gro- α /CXCL1, d'IL-8/CXCL8 et de MCP-1/CCL2 par des macrophages et des cellules épithéliales pulmonaires obtenus à partir des mêmes donneurs, mais leurs effets autocrines sont plus importants pour les cellules épithéliales que pour les macrophages. De plus, leurs travaux ont mis en évidence la phosphorylation d'ERK1/2 et de p38 suite à l'exposition des macrophages au LPS. Cela n'a pas été observé sur les cellules épithéliales. Ceci suggère que ces deux types cellulaires présentent des différences concernant des voies de signalisation et la libération des cytokines en réponse au LPS. (Thorley et al., 2007).

Deux types cellulaires bien distincts, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires, sont ainsi présents dans l'alvéole pulmonaire. Nous nous sommes intéressés aux effets du CSE seul ou associé au LPS sur une co-culture de macrophages et de cellules épithéliales. Notre travail permet d'observer une augmentation d'IL-8/CXCL8 et d'IL-6 après exposition au LPS 0,1 μ g/ml, mais le CSE n'a pas d'effet sur les taux de base ou induits en co-culture. De plus, l'effet anti-inflammatoire du CSE sur les macrophages et les effets additifs du CSE sur les cellules épithéliales ne sont plus observés dans la co-culture.

Il est clair que la libération basale ou induite de cytokines par le LPS, peut être altérée par la fumée de cigarette différemment dans ces deux types cellulaires. Mais, nos expérimentations ne permettent pas d'expliquer ces phénomènes. Nous suggérons que la libération de ces cytokines par les cellules épithéliales et les macrophages implique des récepteurs et des voies de signalisations distinctes. De plus, des patients sains et non fumeurs ont un ratio entre cellules épithéliales et macrophages de 5/1 (Stone et al., 1992). Il est alors possible que les cellules épithéliales jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire, et soient la principale source de chimiokines responsables du recrutement des cellules inflammatoires. Ces cellules peuvent ainsi amplifier la réponse inflammatoire due à l'augmentation de la sécrétion de chimiokines, non seulement par interaction directe avec les différents agents (LPS et/ou fumée de cigarette), mais aussi avec les médiateurs de l'inflammation au travers d'un effet autocrine. Tandis que les macrophages sont surtout susceptibles d'être un modulateur important prévenant une réponse inflammatoire inappropriée ainsi que sa contribution à la libération de protéases.

Le processus inflammatoire chronique provoqué par la fumée de cigarette peut induire la production de MMPs et de TIMPs. Ce déséquilibre protéase/anti-protéase joue un rôle prépondérant dans le développement de la BPCO. Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet du CSE seul ou en combinaison avec le LPS sur la libération de la MMP-9 par des macrophages. Cependant, Russel *et al.* ont mis en évidence une libération de la MMP-9 par des macrophages en culture primaire exposés à la fumée de cigarette (Russell et al., 2002). Nous pensons que notre temps d'exposition (24h) aux différents stimuli est trop long pour observer une libération de MMP-9. En revanche, comme Russel et al., nous avons mis en évidence une diminution de la sécrétion de TIMP-1 par des macrophages après une exposition au CSE, une augmentation significative de sa sécrétion, en présence de LPS et enfin une libération encore plus importante avec la combinaison CSE/LPS.

- *Effets de trois molécules anti- inflammatoire*

L'exposition à la fumée de cigarette est susceptible d'induire une corticorésistance (Barnes and Adcock, 2009). Pour vérifier si le CSE/LPS induit une corticorésistance, les cellules A549 ont été traitées avec le budésonide ou la dexaméthasone avant stimulation par du CSE/LPS. Les deux corticostéroïdes ont induit une inhibition de la libération d'IL-8/CXCL8 induite par le CSE/LPS, ce qui suggère que la corticorésistance n'est pas impliquée

dans notre modèle. Il faut cependant rappeler que la corticorésistance observée chez les patients est relevée aussi bien après une exposition chronique à la fumée de cigarette qu'après administration répétée de médicaments corticoïdes.

Parmi les molécules développées actuellement pour traiter la BPCO, un inhibiteur de phosphodiesterase-4, le roflumilast, a récemment été mis sur le marché. Le profil anti-inflammatoire de ce type de molécules est largement identifié et l'autorisation du roflumilast a été obtenue dans le traitement continu de la BPCO sévère associée à des exacerbations répétées (Buenestado et al., 2011; Diamant and Spina, 2011; Field, 2011; Hatzelmann et al., 2010). Les effets obtenus s'appliquent également au roflumilast-N-oxide, le principal métabolite actif du roflumilast. Dans notre étude, nous avons exploré les effets du roflumilast-N-oxide sur la libération de chimiokines par des cellules A549 et sur les voies de signalisation activées après une exposition à la combinaison CSE/LPS. Nous avons montré que le roflumilast-N-oxide associé à la PGE₂ inhibe la libération de chimiokines après stimulation des cellules A549 par du CSE/LPS. L'utilisation de PGE₂ semble nécessaire dans des modèles *in vitro* puisque Sabatini *et al* ont montré que l'inhibition de la PDE4 était dépendante de la présence de PGE₂ (Sabatini et al., 2010). Nous supposons que les cellules épithéliales ne produisent pas de grandes quantités d'AMPc. Il semble donc difficile d'inhiber sa dégradation en 5'AMP par la PDE4. L'utilisation de PGE₂ permettrait l'activation de l'adénylate cyclase et par conséquent une augmentation d'AMPc intracellulaire, entraînant une inhibition de la PDE4, ce qui pourrait expliquer l'efficacité du roflumilast dans ce modèle. Nos résultats semblent en accord avec la littérature car les effets inhibiteurs du roflumilast et du roflumilast-N-oxide sur la libération de cytokines et de chimiokines, *in vitro* et *in vivo*, ont bien été démontrés. En revanche, les voies de signalisation qui pourraient être affectées par ces molécules ont été rarement étudiées même si certains auteurs ont montré une inhibition de p38 et de p44/42-MAPK par les i-PD4 (Jacob et al., 2004). Nous avons voulu observer l'effet inhibiteur du roflumilast sur la phosphorylation des kinases. En effet, le roflumilast-N-oxide à 1 nM (en présence de 10 nM de PGE₂) a empêché la phosphorylation des MAP kinases, des 7 protéines STAT et des 5 des protéines de la famille Src induites par du CSE/LPS.

Dans le premier chapitre de cette thèse nous avons développé un modèle *in vitro* qui reflète ce qui se passe avec les cellules épithéliales des voies aériennes dans le contexte d'exacerbation de la BPCO. Un effet additif du CSE sur la libération de cytokines a été observé par les cellules épithéliales en contact avec des pathogènes comme des bactéries

Gram négatives. Cet effet additif du CSE pourrait être responsable de la progression et des exacerbations de la BPCO. Cependant, les effets additifs du CSE ne sont pas présents dans tous les types cellulaires pulmonaires. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois le rôle de la voie JAK/STAT dans la libération des cytokines induites par la fumée de cigarette associée au LPS par les cellules A549. À terme, une utilisation thérapeutique d'inhibiteurs, et plus précisément de STAT3, pourrait être intéressante dans le cadre de nouveaux traitements contre la BPCO.

- *Effets de l'élastase du neutrophile sur les cellules épithéliales*

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons mené des recherches *in vitro* sur les effets anti-inflammatoires du roflumilast N-oxide sur les cellules épithéliales alvéolaires stimulées par les neutrophiles élastases.

De nombreuses études montrent que les fumeurs, et en particulier ceux souffrant de BPCO, ont des niveaux élevés de neutrophiles et par conséquent une quantité importante d'élastase libérée dans le milieu extracellulaire (Betsuyaku et al., 1996). Plusieurs auteurs ont mis en évidence que la NE stimule la libération des chimiokines par les cellules épithéliales des voies aériennes (Kuwahara et al., 2006; Witherden et al., 2004). Ainsi, la NE peut potentialiser l'inflammation en stimulant la libération des chimiokines par les cellules épithéliales. En effet, nous avons montré que la NE est capable d'augmenter la libération d'IL-8/CXCL-8, du MCP-1/CCl2 et du Gro- α /CXCL-1 ainsi que l'expression des ARNm par les cellules A549. Comme a été démontré dans cette étude et précédemment, la libération de cytokines induite par une faible concentration de NE (10 nM) est diminuée en fonction des quantités croissantes d'enzyme, probablement en raison de l'effet protéolytique de la NE (Witherden et al., 2004). En effet, la NE à une concentration 50 nM a des effets sur le détachement cellulaire à hauteur d'environ 10%. *In vivo*, l'action de la NE est contrôlée par des inhibiteurs tels que l' α 1-PI, le SLPI, et éventuellement l'élafine. Si ces inhibiteurs sont peu présents ou peu actifs, une activité enzymatique incontrôlée de la NE aura lieu et de faibles concentrations de NE active, inférieures à 10 nM, pourraient stimuler la libération des chimiokines par les cellules épithéliales et potentialiser l'inflammation. Cela a été montré dans les sécrétions pulmonaires chez des patients porteurs de BPCO (Betsuyaku et al., 1996).

Walsh et ses collègues ont montré que la libération de l'IL-8/CXCL8 stimulée par la NE dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques pourrait être bloquée par une

inhibition spécifique de cette enzyme, suggérant que la libération des chimiokines implique une activité protéolytique de la NE, éventuellement *via* l'activation de récepteurs de surface (Walsh et al., 2001). Plusieurs récepteurs de surface cellulaire impliqués dans la libération de chimiokines par la NE ont été proposés. Dulon et al. ont rapporté que la NE inactive le PAR-2 dans deux lignées de cellules épithéliales des voies aériennes, A549 et 16HBE (Dulon et al., 2003). Une autre étude a mis en évidence une stimulation de la libération et de l'expression génique de l'IL-8/CXCL8 par la NE *via* une cascade d'événements impliquant les récepteurs TLR4 (TLR4 → MyD88 IRAK1 → TRAF6 → NF-κB (Walsh et al., 2001)). Des études sur des cellules épithéliales bronchiques rapportent que la transcription du gène de l'IL-8/CXCL8 et la libération de la protéine dépendent d'une activation transitoire du récepteur à l'EGF (Kuwahara et al., 2006). L'EGFR peut être activé par deux processus: la liaison d'un ligand de l'EGFR (par exemple, le TGF- α , l'EGF) qui induit l'activation du récepteur à tyrosine kinase (Hunter and Cooper, 1981; Reynolds et al., 1981) et alternativement, l'activation de l'EGFR peut être induite par un mécanisme indépendant du ligand par exemple, les radicaux libres de l'oxygène (Goldkorn et al., 1998). Kohri et al., ont mis en évidence que la production de MUC5AC induite par la NE se produit *via* le clivage du pro-TGF- α en TGF- α et sa liaison à l'EGFR, mais indépendamment d'un stress oxydant (Kohri et al., 2002).

Il a été démontré que la NE peut activer des MAP kinases, plus précisément les voies ERK et p38. L'augmentation de l'expression du gène codant pour l'IL-8/CXCL8 induite par la NE semble réguler les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 (Chen et al., 2004; Kuwahara et al., 2006). De plus, Sparkman et Boggaram ont rapporté que la stabilité de l'ARNm de l'IL-8/CXCL-8 était augmentée par l'activation de p38 (Sparkman and Boggaram, 2004). D'autre part, Yu et al. ont démontré que p38 induit la synthèse d'IL-8/CXCL-8 par régulation de la traduction plutôt que par stabilisation du transcrit (Yu et al., 2003). Ainsi, plusieurs mécanismes régulent la production d'IL-8/CXCL-8. Nos résultats montrent que la NE induit l'activation de p38. Ceux-ci sont en accord avec d'autres auteurs qui ont mis en évidence que les cellules A549 stimulées avec la NE augmentent leur production d'IL-8/CXCL-8 par la voie p38 (Chen et al., 2004; Kuwahara et al., 2006).

Comme nous l'avons déjà abordé, les fumeurs et en particulier ceux souffrant de BPCO, ont des niveaux élevés de NE (Betsuyaku et al., 1996). La NE peut provoquer une hypersécrétion de mucus et un ralentissement du battement ciliaire. Ces conditions sont propices à la colonisation par des bactéries. Par conséquent, les cellules épithéliales alvéolaires peuvent être exposées aux molécules bactériennes, comme le LPS et la NE. Dans

cette optique, nous avons formulé l'hypothèse que la NE associée au LPS pourrait contribuer à une augmentation de la libération des chimiokines. Nos résultats montrent que le LPS n'entraîne pas d'augmentation de la libération des chimiokines induite par la NE.

Les inhibiteurs de phosphodiésterases 4 semblent être de nouveaux agents capables de supprimer la réponse inflammatoire dans la BPCO. En effet, différentes études ont montré les effets anti-inflammatoires du roflumilast N-oxide. En revanche, les effets de cette molécule sur la libération de chimiokines induite par la NE n'étaient pas encore décrits. Nous nous sommes aussi intéressés à l'action du roflumilast N-oxide sur la stimulation des cellules A549 par la NE. Il a été capable de diminuer le taux de chimiokines induites par la NE de façon dose dépendante. Ces résultats confirment l'effet thérapeutique du roflumilast N-oxide dans la BPCO.

Conclusion et Perspectives

V-CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que la fumée de cigarette et la neutrophile élastase peuvent activer les cellules épithéliales alvéolaires à travers des voies de signalisation distinctes. Ces cellules semblent être les principales sources de chimiokines inflammatoires des voies aériennes. En effet, elles peuvent amplifier la réponse inflammatoire provoquée par la fumée de cigarette lorsqu'elles sont en contact avec des produits bactériens via activation de la voie JAK/STAT. Cet effet synergique pourrait être responsable de la progression et de l'exacerbation d'origine bactérienne de la BPCO.

Nous avons aussi montré que la NE induit la libération de chimiokines par les cellules épithéliales alvéolaires par activation de la voie p38. En revanche, les effets additifs ne sont pas présents quand la NE est associée au LPS. Cependant, la roflumilast N-oxde est capable d'inhiber la libération de cytokines induites ou par la NE ou par le CSE/LPS, mettant alors en lumière d'autres voies de signalisation par lesquelles cette molécule exerce son effet anti-inflammatoire dans le contexte de la BPCO.

Les perspectives de ce travail sont de plusieurs types:

D'une part, il conviendrait de confirmer ces résultats avec une culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires. En effet, les premiers résultats obtenus sur des cultures primaires bronchiques permettaient de mettre en évidence des résultats similaires notamment pour la libération d'Il-8 mais différents pour d'autres chimiokines étudiées. Il conviendrait donc de voir si ce type de résultats est également obtenu au niveau alvéolaire.

Des études complémentaires devraient également être menées sur des monocytes en culture primaire. En effet, ces cellules sont aujourd'hui très étudiées et de nombreux résultats montrent qu'elles ont une plus forte réactivité par rapport aux macrophages. Compte tenu de l'infiltration de monocytes dans le poumon dans le contexte de la BPCO, il est donc essentiel de bien connaître les effets de la CSE sur ce type cellulaire.

D'autres études pourraient également être réalisées, notamment sur de co-culture de macrophages et/ou de monocytes et de cellules épithéliales, de manière à connaître les mécanismes d'interactions entre ces deux types cellulaires majeurs.

D'une part l'implication de la voie de signalisation JAK/STAT doit être confirmée par l'usage d'inhibiteurs spécifiques (Nom d'inhibiteur ?) ou de Si RNA ciblés dans les mêmes

conditions expérimentales que celles que nous avons choisies. Ceci nous permettrait de bien connaître l'implication de cette voie dans la libération de chimiokines. Ces travaux pourraient être menés également sur des macrophages et des monocytes en culture de manière à comparer l'intervention des voies de signalisation dans ces types cellulaires.

Si ces inhibiteurs fonctionnaient, ils pourraient être évalués dans des modèles *in vivo* chez la souris exposée à la fumée de cigarette ou au LPS d'*Escherichia coli*.

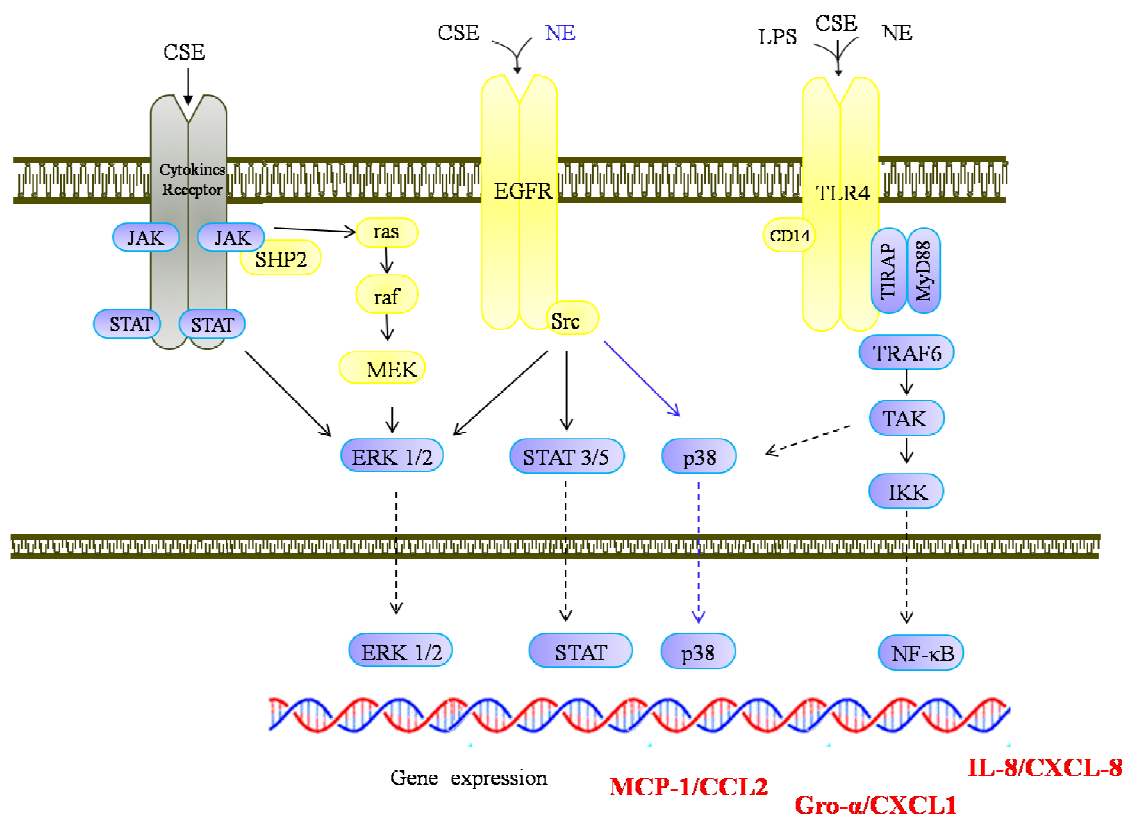


Figure 27 : Schéma sur les différents récepteurs et voies de signalisation qui peuvent être activés par la fumée de cigarette, par le LPS et par la NE.

Références

- Adamson, J., D. Azzopardi, G. Errington, C. Dickens, J. McAughey, and M.D. Gaca. 2011. Assessment of an in vitro whole cigarette smoke exposure system: The Borgwaldt RM20S 8-syringe smoking machine. *Chem Cent J.* 5:50.
- Adcock, I.M., K.F. Chung, G. Caramori, and K. Ito. 2006. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 533:118-32.
- Adkison, A.M., S.Z. Raptis, D.G. Kelley, and C.T. Pham. 2002. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest.* 109:363-71.
- Adler, K.B., B.M. Fischer, D.T. Wright, L.A. Cohn, and S. Becker. 1994. Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 725:128-45.
- Alvarez, J.I. 2005. Inhibition of Toll Like Receptor immune responses by microbial pathogens. *Front Biosci.* 10:582-7.
- Amitani, R., R. Wilson, A. Rutman, R. Read, C. Ward, D. Burnett, R.A. Stockley, and P.J. Cole. 1991. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4:26-32.
- Anderson, H.R., C. Spix, S. Medina, J.P. Schouten, J. Castellsague, G. Rossi, D. Zmirou, G. Touloumi, B. Wojtyniak, A. Ponka, L. Bacharova, J. Schwartz, and K. Katsouyanni. 1997. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *Eur Respir J.* 10:1064-71.
- Ariel, A., E.J. Yavin, R. HersHKoviz, A. Avron, S. Franitza, I. Hardan, L. Cahalon, M. Fridkin, and O. Lider. 1998. IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol.* 161:2465-72.
- Arredondo, J., A.I. Chernyavsky, and S.A. Grando. 2006. Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol Ther.* 5:511-7.
- Avila, M., A. Martinez-Juarez, A. Ibarra-Sanchez, and C. Gonzalez-Espinosa. 2012. Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells. *Innate Immun.* 18:648-60.
- Babusyte, A., K. Stravinskaite, J. Jeroch, J. Lotvall, R. Sakalauskas, and B. Sitkauskiene. 2007. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respir Res.* 8:81.
- Balakrishnan, K., S. Sankar, J. Parikh, R. Padmavathi, K. Srividya, V. Venugopal, S. Prasad, and V.L. Pandey. 2002. Daily average exposures to respirable particulate matter from combustion of biomass fuels in rural households of southern India. *Environ Health Perspect.* 110:1069-75.
- Banda, M.J., A.G. Rice, G.L. Griffin, and R.M. Senior. 1988. Alpha 1-proteinase inhibitor is a neutrophil chemoattractant after proteolytic inactivation by macrophage elastase. *J Biol Chem.* 263:4481-4.
- Banda, M.J., and Z. Werb. 1981. Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem J.* 193:589-605.
- Bank, U., B. Kupper, and S. Ansorge. 2000. Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains. *Adv Exp Med Biol.* 477:431-7.
- Bank, U., B. Kupper, D. Reinhold, T. Hoffmann, and S. Ansorge. 1999. Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett.* 461:235-40.
- Barnes, P.J. 2000. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 343:269-80.
- Barnes, P.J. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease * 12: New treatments for COPD. *Thorax.* 58:803-8.
- Barnes, P.J. 2004a. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc.* 1:264-8.
- Barnes, P.J. 2004b. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev.* 56:515-48.

- Barnes, P.J. 2006. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest*. 129:151-5.
- Barnes, P.J. 2009. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 41:631-8.
- Barnes, P.J., and I.M. Adcock. 2009. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 373:1905-17.
- Barnes, P.J., and M.G. Cosio. 2004. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med*. 1:e20.
- Barnes, P.J., S.D. Shapiro, and R.A. Pauwels. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 22:672-88.
- Barnes, P.J., and R.A. Stockley. 2005. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J*. 25:1084-106.
- Bazzoni, F., M.A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald, and M. Baggiolini. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med*. 173:771-4.
- Becker, S., J. Quay, H.S. Koren, and J.S. Haskill. 1994. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol*. 266:L278-86.
- Belaouaj, A., K.S. Kim, and S.D. Shapiro. 2000. Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. *Science*. 289:1185-8.
- Belaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T.J. Ley, S.N. Abraham, and S.D. Shapiro. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 4:615-8.
- Belvisi, M.G., D.J. Hele, and M.A. Birrell. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 533:101-9.
- Bergensfeldt, M., L. Axelsson, and K. Ohlsson. 1992. Release of neutrophil proteinase 4(3) and leukocyte elastase during phagocytosis and their interaction with proteinase inhibitors. *Scand J Clin Lab Invest*. 52:823-9.
- Bergin, D.A., C.M. Greene, E.E. Sterchi, C. Kenna, P. Geraghty, A. Belaouaj, C.C. Taggart, S.J. O'Neill, and N.G. McElvaney. 2008. Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloprotease pathway. *J Biol Chem*. 283:31736-44.
- Betsuyaku, T., M. Nishimura, A. Yoshioka, K. Takeyabu, K. Miyamoto, and Y. Kawakami. 1996. [Neutrophil elastase and elastin-derived peptides in BAL fluid and emphysematous changes on CT scans]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 34 Suppl:69-74.
- Bhattacharyya, S., U. Gutti, J. Mercado, C. Moore, H.B. Pollard, and R. Biswas. 2010. MAPK signaling pathways regulate IL-8 mRNA stability and IL-8 protein expression in cystic fibrosis lung epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 300:L81-7.
- Bhowmik, A., T.A. Seemungal, R.J. Sapsford, and J.A. Wedzicha. 2000. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 55:114-20.
- Biernacki, W.A., S.A. Kharitonov, and P.J. Barnes. 2003. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax*. 58:294-8.
- Biondo, C., G. Mancuso, C. Beninati, C. Iaria, O. Romeo, A. Cascio, and G. Teti. 2012. The role of endosomal toll-like receptors in bacterial recognition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 16:1506-12.
- Birrell, M.A., S. Wong, M.C. Catley, and M.G. Belvisi. 2008. Impact of tobacco-smoke on key signaling pathways in the innate immune response in lung macrophages. *J Cell Physiol*. 214:27-37.
- Birrell, M.A., S. Wong, E.L. Hardaker, M.C. Catley, K. McCluskie, M. Collins, S. Haj-Yahia, and M.G. Belvisi. 2006. IkappaB kinase-2-independent and -dependent inflammation in airway disease models: relevance of IKK-2 inhibition to the clinic. *Mol Pharmacol*. 69:1791-800.

- Biswas, S.K., and A. Sodhi. 2002. Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol.* 2:1095-107.
- Boudier, C., G. Godeau, W. Hornebeck, L. Robert, and J.G. Bieth. 1991. The elastolytic activity of cathepsin G: an ex vivo study with dermal elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4:497-503.
- Boutten, A., P. Venembre, N. Seta, J. Hamelin, M. Aubier, G. Durand, and M.S. Dehoux. 1998. Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:511-20.
- Brusselle, G.G., K.R. Bracke, T. Maes, I. D'Hulst A, K.B. Moerloose, G.F. Joos, and R.A. Pauwels. 2006. Murine models of COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 19:155-65.
- Bucchioni, E., S.A. Kharitonov, L. Allegra, and P.J. Barnes. 2003. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med.* 97:1299-302.
- Buenestado, A., S. Grassin-Delyle, F. Guitard, E. Naline, C. Faisy, D. Israel-Biet, E. Sage, J.F. Bellamy, H. Tenor, and P. Devillier. 2011. Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-alpha from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 165:1877-90.
- Bundschuh, D.S., M. Eltze, J. Barsig, L. Wollin, A. Hatzelmann, and R. Beume. 2001. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:280-90.
- Byun, S., J. Park, E. Lee, S. Lim, J.G. Yu, S.J. Lee, H. Chen, Z. Dong, K.W. Lee, and H.J. Lee. 2012. Src kinase is a direct target of apigenin against UVB-induced skin inflammation. *Carcinogenesis.* 34:397-405.
- Caneva, J.O., C.A. Rabec, M.C. De Salvo, and J.A. Mazzei. 2001. [Physiopathology, diagnosis and treatment of severe chronic hypoxemia. Role of residential chronic oxygen therapy]. *Medicina (B Aires).* 61:453-69.
- Capelli, A., A. Di Stefano, I. Gnemmi, P. Balbo, C.G. Cerutti, B. Balbi, M. Lusuardi, and C.F. Donner. 1999. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J.* 14:160-5.
- Cappello, F., G. Caramori, C. Campanella, C. Vicari, I. Gnemmi, A. Zanini, A. Spanevello, A. Capelli, G. La Rocca, R. Anzalone, F. Bucchieri, S.E. D'Anna, F.L. Ricciardolo, P. Brun, B. Balbi, M. Carone, G. Zummo, E. Conway de Macario, A.J. Macario, and A. Di Stefano. 2010. Convergent sets of data from in vivo and in vitro methods point to an active role of Hsp60 in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *PLoS One.* 6:e28200.
- Carolan, B.J., and E.R. Sutherland. 2013. Clinical phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease and asthma: recent advances. *J Allergy Clin Immunol.* 131:627-34; quiz 635.
- Cataldo, D., C. Munaut, A. Noel, F. Frankenke, P. Bartsch, J.M. Foidart, and R. Louis. 2000. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 123:259-67.
- Celli, B.R., and P.J. Barnes. 2007. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 29:1224-38.
- Chang, W.C., Y.C. Lee, C.L. Liu, J.D. Hsu, H.C. Wang, C.C. Chen, and C.J. Wang. 2001. Increased expression of iNOS and c-fos via regulation of protein tyrosine phosphorylation and MEK1/ERK2 proteins in terminal bronchiole lesions in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *Arch Toxicol.* 75:28-35.
- Chao, H.M., M.J. Chuang, J.H. Liu, X.Q. Liu, L.K. Ho, W.H. Pan, X.M. Zhang, C.M. Liu, S.K. Tsai, C.W. Kong, S.D. Lee, M.M. Chen, and F.P. Chao. 2013. Baicalein Protects Against Retinal Ischemia by Antioxidation, Antiapoptosis, Downregulation of HIF-1alpha, VEGF, and MMP-9 and Upregulation of HO-1. *J Ocul Pharmacol Ther.*
- Chapman, R.W., M. Minnicozzi, C.S. Celly, J.E. Phillips, T.T. Kung, R.W. Hipkin, X. Fan, D. Rindgen, G. Deno, R. Bond, W. Gonsiorek, M.M. Billah, J.S. Fine, and J.A. Hey. 2007. A novel, orally active

- CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 322:486-93.
- Chen, H.C., H.C. Lin, C.Y. Liu, C.H. Wang, T. Hwang, T.T. Huang, C.H. Lin, and H.P. Kuo. 2004. Neutrophil elastase induces IL-8 synthesis by lung epithelial cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biomed Sci.* 11:49-58.
- Chen, J.C., and D.M. Mannino. 1999. Worldwide epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 5:93-9.
- Chen, J.J., P.L. Yao, A. Yuan, T.M. Hong, C.T. Shun, M.L. Kuo, Y.C. Lee, and P.C. Yang. 2003. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 9:729-37.
- Choi, B., E. Chun, S.Y. Kim, M. Kim, K.Y. Lee, and S.J. Kim. 2012. Notch-induced hIL-6 production facilitates the maintenance of self-renewal of hCD34+ cord blood cells through the activation of Jak-PI3K-STAT3 pathway. *Am J Pathol.* 180:351-64.
- Chrysafakis, G., N. Tzanakis, D. Kyriakoy, M. Tsoumakidou, I. Tsiligianni, M. Klimathianaki, and N.M. Siafakas. 2004. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest.* 125:71-6.
- Churg, A., R. Wang, X. Wang, P.O. Onnervik, K. Thim, and J.L. Wright. 2007a. An MMP-9/-12 Inhibitor Prevents Smoke-induced Emphysema and Small Airway Remodeling in Guinea Pigs. *Thorax.*
- Churg, A., R.D. Wang, H. Tai, X. Wang, C. Xie, and J.L. Wright. 2004. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med.* 170:492-8.
- Churg, A., X. Wang, R.D. Wang, S.C. Meixner, E.L. Prydzial, and J.L. Wright. 2007b. Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37:144-51.
- Churg, A., and J.L. Wright. 2007. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. *Contrib Microbiol.* 14:113-25.
- Churg, A., K. Zay, S. Shay, C. Xie, S.D. Shapiro, R. Hendricks, and J.L. Wright. 2002. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:368-74.
- Churg, A., S. Zhou, and J.L. Wright. 2011. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J.* 39:197-209.
- Clark, J.M., B.M. Aiken, D.W. Vaughan, and H.M. Kagan. 1980. Ultrastructural localization of elastase-like enzymes in human neutrophils. *J Histochem Cytochem.* 28:90-2.
- Clunes, L.A., A. Bridges, N. Alexis, and R. Tarran. 2008. In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels following cigarette smoke exposure. *J Anal Toxicol.* 32:201-7.
- Cohen, P. 2002. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov.* 1:309-15.
- Connors, A.F., Jr., N.V. Dawson, C. Thomas, F.E. Harrell, Jr., N. Desbiens, W.J. Fulkerson, P. Kussin, P. Bellamy, L. Goldman, and W.A. Knaus. 1996. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med.* 154:959-67.
- Corbel, M., V. Lagente, N. Theret, N. Germain, B. Clement, and E. Boichot. 1999. Comparative effects of betamethasone, cyclosporin and nedocromil sodium in acute pulmonary inflammation and metalloproteinase activities in bronchoalveolar lavage fluid from mice exposed to lipopolysaccharide. *Pulm Pharmacol Ther.* 12:165-71.
- Cortijo Gimeno, J., and E. Morcillo Sanchez. 2010. [Pharmacological profile of roflumilast]. *Arch Bronconeumol.* 46 Suppl 10:19-24.

- Cosio, B.G., L. Tsaprouni, K. Ito, E. Jazrawi, I.M. Adcock, and P.J. Barnes. 2004. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med.* 200:689-95.
- Costa, C., R. Rufino, S.L. Traves, E.S.J.R. Lapa, P.J. Barnes, and L.E. Donnelly. 2008. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest.* 133:26-33.
- Couillin, I., V. Vasseur, S. Charron, P. Gasse, M. Tavernier, J. Guillet, V. Lagente, L. Fick, M. Jacobs, F.R. Coelho, R. Moser, and B. Ryffel. 2009. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol.* 183:8195-202.
- Culpitt, S.V., D.F. Rogers, P.S. Fenwick, P. Shah, C. De Matos, R.E. Russell, P.J. Barnes, and L.E. Donnelly. 2003. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax.* 58:942-6.
- Cumashi, A., H. Ansuini, N. Celli, A. De Blasi, P.J. O'Brien, L.F. Brass, and M. Molino. 2001. Neutrophil proteases can inactivate human PAR3 and abolish the co-receptor function of PAR3 on murine platelets. *Thromb Haemost.* 85:533-8.
- de Boer, W.I., J.K. Sont, A. van Schadewijk, J. Stolk, J.H. van Krieken, and P.S. Hiemstra. 2000. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol.* 190:619-26.
- de Jonge, W.J., E.P. van der Zanden, F.O. The, M.F. Bijlsma, D.J. van Westerloo, R.J. Bennink, H.R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R.M. van den Wijngaard, and G.E. Boeckxstaens. 2005. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 6:844-51.
- Delhase, M., N. Li, and M. Karin. 2000. Kinase regulation in inflammatory response. *Nature.* 406:367-8.
- Dentener, M.A., E.C. Creutzberg, H.J. Pennings, G.T. Rijkers, E. Mercken, and E.F. Wouters. 2008. Effect of infliximab on local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study. *Respiration.* 76:275-82.
- Deshmukh, H.S., C. Shaver, L.M. Case, M. Dietsch, S.C. Wesselkamper, W.D. Hardie, T.R. Korfhagen, M. Corradi, J.A. Nadel, M.T. Borchers, and G.D. Leikauf. 2008. Acrolein-activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38:446-54.
- Devalaraja, M.N., and A. Richmond. 1999. Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci.* 20:151-6.
- Dhami, R., B. Gilks, C. Xie, K. Zay, J.L. Wright, and A. Churg. 2000. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:244-52.
- Di Stefano, A., A. Capelli, M. Lusuardi, P. Balbo, C. Vecchio, P. Maestrelli, C.E. Mapp, L.M. Fabbri, C.F. Donner, and M. Saetta. 1998. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1277-85.
- Di Stefano, A., A. Capelli, M. Lusuardi, G. Caramori, P. Balbo, F. Ioli, S. Sacco, I. Gnemmi, P. Brun, I.M. Adcock, B. Balbi, P.J. Barnes, K.F. Chung, and C.F. Donner. 2001. Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy.* 31:893-902.
- Di Stefano, A., P. Maestrelli, A. Roggeri, G. Turato, S. Calabro, A. Potena, C.E. Mapp, A. Ciaccia, L. Covacev, L.M. Fabbri, and M. Saetta. 1994. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:803-10.
- Diamant, Z., and D. Spina. 2011. PDE4-inhibitors: a novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 24:353-60.
- Diaz, E., N. Bruce, D. Pope, R.T. Lie, A. Diaz, B. Arana, K.R. Smith, and T. Smith-Sivertsen. 2007. Lung function and symptoms among indigenous Mayan women exposed to high levels of indoor air pollution. *Int J Tuberc Lung Dis.* 11:1372-9.

- Donaldson, G.C., T.A. Seemungal, A. Bhowmik, and J.A. Wedzicha. 2002. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 57:847-52.
- Doring, G., F. Frank, C. Boudier, S. Herbert, B. Fleischer, and G. Bellon. 1995. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*. 154:4842-50.
- Dorman, G., S. Cseh, I. Hajdu, L. Barna, D. Konya, K. Kupai, L. Kovacs, and P. Ferdinandy. 2010. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs*. 70:949-64.
- Doumas, S., A. Kolokotronis, and P. Stefanopoulos. 2005. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun*. 73:1271-4.
- Doz, E., N. Noulain, E. Boichot, I. Guenon, L. Fick, M. Le Bert, V. Lagente, B. Ryffel, B. Schnyder, V.F. Quesniaux, and I. Couillin. 2008. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol*. 180:1169-78.
- Dulon, S., C. Cande, N.W. Bunnett, M.D. Hollenberg, M. Chignard, and D. Pidard. 2003. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 28:339-46.
- Eriksson, S. 1964. Pulmonary Emphysema and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Acta Med Scand*. 175:197-205.
- Facchinetti, F., F. Amadei, P. Geppetti, F. Tarantini, C. Di Serio, A. Dragotto, P.M. Gigli, S. Catinella, M. Civelli, and R. Patacchini. 2007. Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 37:617-23.
- Fan Chung, K. 2006. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 533:110-7.
- Field, S.K. 2011. Roflumilast, a Novel Phosphodiesterase 4 Inhibitor, for COPD Patients with a History of Exacerbations. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 5:57-70.
- Finkelstein, R., R.S. Fraser, H. Ghezzi, and M.G. Cosio. 1995. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 152:1666-72.
- Finlay, G.A., L.R. O'Driscoll, K.J. Russell, E.M. D'Arcy, J.B. Masterson, M.X. FitzGerald, and C.M. O'Connor. 1997a. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 156:240-7.
- Finlay, G.A., K.J. Russell, K.J. McMahon, M. D'Arcy E, J.B. Masterson, M.X. FitzGerald, and C.M. O'Connor. 1997b. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*. 52:502-6.
- Fischer, B., and J. Voynow. 2000. Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest*. 117:317S-20S.
- Fitch, P.M., A. Roghanian, S.E. Howie, and J.M. Sallenave. 2006. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans*. 34:279-82.
- Fuhrman, C., E. Jougla, J. Nicolau, D. Eilstein, and M.C. Delmas. 2006. Deaths from chronic obstructive pulmonary disease in France, 1979-2002: a multiple cause analysis. *Thorax*. 61:930-4.
- Furukawa, Y., A. Matsumori, N. Ohashi, T. Shioi, K. Ono, A. Harada, K. Matsushima, and S. Sasayama. 1999. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res*. 84:306-14.
- Gallelli, L., G. Pelaia, D. Fratto, V. Muto, D. Falcone, A. Vatrella, L.S. Curto, T. Renda, M.T. Busceti, M.C. Liberto, R. Savino, M. Cazzola, S.A. Marsico, and R. Maselli. 2010. Effects of budesonide on P38 MAPK activation, apoptosis and IL-8 secretion, induced by TNF-alpha and Haemophilus influenzae in human bronchial epithelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 23:471-9.
- Gartlehner, G., R.A. Hansen, D. Nissman, K.N. Lohr, and T.S. Carey. 2006. A simple and valid tool distinguished efficacy from effectiveness studies. *J Clin Epidemiol*. 59:1040-8.

- Gearing, A.J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A.H. Davidson, A.H. Drummond, W.A. Galloway, R. Gilbert, J.L. Gordon, and et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*. 370:555-7.
- Gensch, E., M. Gallup, A. Sucher, D. Li, A. Gebremichael, H. Lemjabbar, A. Mengistab, V. Dasari, J. Hotchkiss, J. Harkema, and C. Basbaum. 2004. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem*. 279:39085-93.
- Geraghty, P., M.P. Rogan, C.M. Greene, R.M. Boxio, T. Poiriert, M. O'Mahony, A. Belaaouaj, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, and N.G. McElvaney. 2007. Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. *J Immunol*. 178:5871-8.
- Giembycz, M.A., and S.K. Field. 2010. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. *Drug Des Devel Ther*. 4:147-58.
- Ginzberg, H.H., V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C.A. McCulloch, P.T. Shannon, and G.P. Downey. 2001. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 281:G705-17.
- GOLD. 2006. Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease.
- Goldkorn, T., N. Balaban, K. Matsukuma, V. Chea, R. Gould, J. Last, C. Chan, and C. Chavez. 1998. EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:786-98.
- Gooptu, B., U.I. Ekeowa, and D.A. Lomas. 2009. Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J*. 34:475-88.
- Goyal, A., M. Konar, A. Setia, A. Narang, and S. Ghosh. 2010. Galactose specific adhesin of enteroaggregative E. coli induces IL-8 secretion via activation of MAPK and STAT-3 in INT-407 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1800:574-9.
- Griffin, M., R. Bhandari, G. Hamilton, Y.C. Chan, and J.T. Powell. 1993. Alveolar type II cell-fibroblast interactions, synthesis and secretion of surfactant and type I collagen. *J Cell Sci*. 105 (Pt 2):423-32.
- Gringhuis, S.I., J. den Dunnen, M. Litjens, B. van Het Hof, Y. van Kooyk, and T.B. Geijtenbeek. 2007. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*. 26:605-16.
- Gross, P., E.A. Pfitzer, E. Tolker, M.A. Babyak, and M. Kaschak. 1965. Experimental Emphysema: Its Production with Papain in Normal and Silicotic Rats. *Arch Environ Health*. 11:50-8.
- Guerassimov, A., Y. Hoshino, Y. Takubo, A. Turcotte, M. Yamamoto, H. Ghezzi, A. Triantafillopoulos, K. Whittaker, J.R. Hoidal, and M.G. Cosio. 2004. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med*. 170:974-80.
- Gullberg, U., E. Andersson, D. Garwicz, A. Lindmark, and I. Olsson. 1997. Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol*. 58:137-53.
- Gunawardena, K.A., H. Gullstrand, and J. Perrett. 2013. Pharmacokinetics and safety of AZD9668, an oral neutrophil elastase inhibitor, in healthy volunteers and patients with COPD. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 51:288-304.
- Haddad, J.J. 2004. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immunopharmacoredox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol*. 4:475-93.
- Hartl, D., P. Latzin, P. Hordijk, V. Marcos, C. Rudolph, M. Woischnik, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, D. Reinhardt, A.A. Roscher, D. Roos, and M. Griesse. 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med*. 13:1423-30.
- Hasday, J.D., R. Bascom, J.J. Costa, T. Fitzgerald, and W. Dubin. 1999. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest*. 115:829-35.

- Hashimoto, S., Y. Gon, Y. Asai, T. Machino, I. Jibiki, I. Takeshita, H. Anazawa, and T. Horie. 1999a. p38 MAP kinase regulates RANTES production by TNF-alpha-stimulated human pulmonary vascular endothelial cells. *Allergy*. 54:1168-72.
- Hashimoto, S., K. Matsumoto, Y. Gon, T. Nakayama, I. Takeshita, and T. Horie. 1999b. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med*. 159:634-40.
- Hashimoto, S., Y. Okayama, N. Shime, A. Kimura, Y. Funakoshi, K. Kawabata, A. Ishizaka, and F. Amaya. 2008. Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Respirology*. 13:581-4.
- Haswell, L.E., K. Hewitt, D. Thorne, A. Richter, and M.D. Gaca. 2010. Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potential model of goblet cell hyperplasia. *Toxicol In Vitro*. 24:981-7.
- Hatzelmann, A., E.J. Morcillo, G. Lungarella, S. Adnot, S. Sanjar, R. Beume, C. Schudt, and H. Tenor. 2010. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 23:235-56.
- Hautamaki, R.D., D.K. Kobayashi, R.M. Senior, and S.D. Shapiro. 1997. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 277:2002-4.
- Herzog, E.L., A.R. Brody, T.V. Colby, R. Mason, and M.C. Williams. 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc*. 5:778-82.
- Heusch, W.L., and R. Maneckjee. 1998. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 19:551-6.
- Hirche, T.O., R. Benabid, G. Deslee, S. Gangloff, S. Achilefu, M. Guenounou, F. Lebagry, R.E. Hancock, and A. Belaaouaj. 2008. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol*. 181:4945-54.
- Hogg, J.C. 2004. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 364:709-21.
- Hogg, J.C., and W. Timens. 2009. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol*. 4:435-59.
- Houghton, A.M., P.A. Quintero, D.L. Perkins, D.K. Kobayashi, D.G. Kelley, L.A. Marconcini, R.P. Mecham, R.M. Senior, and S.D. Shapiro. 2006. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest*. 116:753-9.
- Houslay, M.D., and D.R. Adams. 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*. 370:1-18.
- Hulbert, W.M., T. McLean, and J.C. Hogg. 1985. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*. 132:7-11.
- Hunter, T., and J.A. Cooper. 1981. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell*. 24:741-52.
- Ip, W.K., C.K. Wong, and C.W. Lam. 2006. Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin Exp Immunol*. 145:162-72.
- Iqbal, J., and M. Zaidi. 2005. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 328:751-5.
- Issa, R., S. Xie, K.Y. Lee, R.D. Stanbridge, P. Bhavsar, M.B. Sukkar, and K.F. Chung. 2006. GRO-alpha regulation in airway smooth muscle by IL-1beta and TNF-alpha: role of NF-kappaB and MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:L66-74.
- Ito, K., M. Ito, W.M. Elliott, B. Cosio, G. Caramori, O.M. Kon, A. Barczyk, S. Hayashi, I.M. Adcock, J.C. Hogg, and P.J. Barnes. 2005. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 352:1967-76.

- Ito, K., S. Lim, G. Caramori, K.F. Chung, P.J. Barnes, and I.M. Adcock. 2001. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *Faseb J.* 15:1110-2.
- Ito, K., S. Lim, G. Caramori, B. Cosio, K.F. Chung, I.M. Adcock, and P.J. Barnes. 2002. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8921-6.
- Itoh, Y., and H. Nagase. 1995. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem.* 270:16518-21.
- Jackson, P.L., X. Xu, L. Wilson, N.M. Weathington, J.P. Clancy, J.E. Blalock, and A. Gaggar. 2010. Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction. *Mol Med.* 16:159-66.
- Jacob, C., C. Szilagy, J.M. Allen, C. Bertrand, and V. Lagente. 2004. Role of PDE4 in superoxide anion generation through p44/42MAPK regulation: a cAMP and a PKA-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* 143:257-68.
- Jagiello, P.J., P.S. Thorne, J.L. Watt, K.L. Frees, T.J. Quinn, and D.A. Schwartz. 1996. Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest.* 110:263-70.
- Janoff, A., and J. Scherer. 1968. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 128:1137-55.
- Janoff, A., B. Sloan, G. Weinbaum, V. Damiano, R.A. Sandhaus, J. Elias, and P. Kimbel. 1977. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis.* 115:461-78.
- Johnson, M.D., J. Schilz, M.V. Djordjevic, J.R. Rice, and P.G. Shields. 2009. Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18:3263-304.
- Jones, S.A., B. Dewald, I. Clark-Lewis, and M. Baggiolini. 1997. Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J Biol Chem.* 272:16166-9.
- Joos, G.F., V.J. Schelfhout, R.A. Pauwels, F. Kannies, H. Magnussen, R. Lamarca, J.M. Jansat, and E. Garcia Gil. 2010. Bronchodilatory effects of acridinium bromide, a long-acting muscarinic antagonist, in COPD patients. *Respir Med.* 104:865-72.
- Kampf, C., A.J. Relova, S. Sandler, and G.M. Roomans. 1999. Effects of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-beta on normal human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 14:84-91.
- Kawabata, K., M. Suzuki, M. Sugitani, K. Imaki, M. Toda, and T. Miyamoto. 1991. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem Biophys Res Commun.* 177:814-20.
- Keatings, V.M., and P.J. Barnes. 1997. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:449-53.
- Keatings, V.M., P.D. Collins, D.M. Scott, and P.J. Barnes. 1996. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:530-4.
- Kendrick, K.R., S.C. Baxi, and R.M. Smith. 2000. Usefulness of the modified 0-10 Borg scale in assessing the degree of dyspnea in patients with COPD and asthma. *J Emerg Nurs.* 26:216-22.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C.W. Schindler. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene.* 285:1-24.
- Kitagawa, D., S. Tanemura, S. Ohata, N. Shimizu, J. Seo, G. Nishitai, T. Watanabe, K. Nakagawa, H. Kishimoto, T. Wada, T. Tezuka, T. Yamamoto, H. Nishina, and T. Katada. 2002. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J Biol Chem.* 277:366-71.

- Kobayashi, M., Y. Nasuhara, T. Betsuyaku, E. Shibuya, Y. Tanino, M. Tanino, K. Takamura, K. Nagai, T. Hosokawa, and M. Nishimura. 2004. Effect of low-dose theophylline on airway inflammation in COPD. *Respirology*. 9:249-54.
- Kode, A., S.R. Yang, and I. Rahman. 2006. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res*. 7:132.
- Kohri, K., I.F. Ueki, and J.A. Nadel. 2002. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283:L531-40.
- Korsgren, M., M. Linden, N. Entwistle, J. Cook, P. Wollmer, M. Andersson, B. Larsson, and L. Greiff. 2011. Inhalation of LPS induces inflammatory airway responses mimicking characteristics of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Physiol Funct Imaging*. 32:71-9.
- Koyama, S., S.I. Rennard, G.D. Leikauf, and R.A. Robbins. 1991. Bronchial epithelial cells release monocyte chemotactic activity in response to smoke and endotoxin. *J Immunol*. 147:972-9.
- Kretschmar, S., L. Yin, F. Roberts, R. London, T.T. Flemmig, D. Arushanov, K. Kaiyala, and W.O. Chung. 2011. Protease inhibitor levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*. 47:228-35.
- Kuhn, C., S.Y. Yu, M. Chraplyvy, H.E. Linder, and R.M. Senior. 1976. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest*. 34:372-80.
- Kuschner, W.G., A. D'Alessandro, H. Wong, and P.D. Blanc. 1996. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J*. 9:1989-94.
- Kuwahara, I., E.P. Lillehoj, W. Lu, I.S. Singh, Y. Isohama, T. Miyata, and K.C. Kim. 2006. Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF- κ B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:L407-16.
- Kvarnhammar, A.M., and L.O. Cardell. 2012. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*. 136:11-20.
- Laan, M., S. Bozinovski, and G.P. Anderson. 2004. Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 173:4164-70.
- Lacoste, J.Y., J. Bousquet, P. Chanez, T. Van Vyve, J. Simony-Lafontaine, N. Lequeu, P. Vic, I. Enander, P. Godard, and F.B. Michel. 1993. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 92:537-48.
- Lancaster, T., L. Stead, C. Silagy, and A. Sowden. 2000. Effectiveness of interventions to help people stop smoking: findings from the Cochrane Library. *BMJ*. 321:355-8.
- Larsson, K., M. Lindstedt, and C.A. Borrebaeck. 2006. Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology*. 117:156-66.
- Lau, W.K., S.C. Chan, A.C. Law, M.S. Ip, and J.C. Mak. 2011. The role of MAPK and Nrf2 pathways in ketanserin-elicited attenuation of cigarette smoke-induced IL-8 production in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Sci*. 125:569-77.
- Lavigne, M.C., P. Thakker, J. Gunn, A. Wong, J.S. Miyashiro, A.M. Wasserman, S.Q. Wei, J.W. Pelker, M. Kobayashi, and M.J. Eppihimer. 2004. Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun*. 324:534-46.
- Le-Barillec, K., D. Pidard, V. Balloy, and M. Chignard. 2000. Human neutrophil cathepsin G down-regulates LPS-mediated monocyte activation through CD14 proteolysis. *J Leukoc Biol*. 68:209-15.
- Le Quement, C., I. Guenon, J.Y. Gillon, V. Lagente, and E. Boichot. 2008. MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 294:L1076-84.

- Leclerc, O., V. Lagente, J.M. Planquois, C. Berthelie, M. Artola, T. Eichholtz, C.P. Bertrand, and F. Schmidlin. 2006. Involvement of MMP-12 and phosphodiesterase type 4 in cigarette smoke-induced inflammation in mice. *Eur Respir J.* 27:1102-9.
- Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter, and et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739-46.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973-83.
- Li, C.J., W. Ning, M.A. Matthay, C.A. Feghali-Bostwick, and A.M. Choi. 2007. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292:L1297-303.
- Li, Y., C. de Haar, M.P. Peppelenbosch, and C.J. van der Woude. 2012. SOCS3 in immune regulation of inflammatory bowel disease and inflammatory bowel disease-related cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23:127-38.
- Liu, K.D., S.L. Gaffen, and M.A. Goldsmith. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol.* 10:271-8.
- Liu, R., K. Aupperle, and R. Terkeltaub. 2001. Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells. *J Leukoc Biol.* 70:961-8.
- Liu, S., Y. Zhou, X. Wang, D. Wang, J. Lu, J. Zheng, N. Zhong, and P. Ran. 2007. Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax.* 62:889-97.
- Luo, X.H., L.J. Guo, P.F. Shan, H. Xie, X.P. Wu, H. Zhang, X.Z. Cao, L.Q. Yuan, and E.Y. Liao. 2006. Relationship of circulating MMP-2, MMP-1, and TIMP-1 levels with bone biochemical markers and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Osteoporos Int.* 17:521-6.
- MacRedmond, R.E., C.M. Greene, D.R. Dorscheid, N.G. McElvaney, and S.J. O'Neill. 2007. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res.* 8:84.
- Madtes, D.K., A.L. Elston, L.A. Kaback, and J.G. Clark. 2001. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24:599-607.
- Maestrelli, P., M. Saetta, C.E. Mapp, and L.M. Fabbri. 2001. Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:S76-80.
- Mahler, D.A., S. Huang, M. Tabrizi, and G.M. Bell. 2004. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest.* 126:926-34.
- Majo, J., H. Ghezzi, and M.G. Cosio. 2001. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J.* 17:946-53.
- Mal, H., B. Crestani, M. Aubier, and M. Fournier. 1999. Emphysème pulmonaire : évolution des concepts. *médecine/sciences.* 15:833-41.
- March, T.H., E.B. Barr, G.L. Finch, F.F. Hahn, C.H. Hobbs, M.G. Menache, and K.J. Nikula. 1999. Cigarette smoke exposure produces more evidence of emphysema in B6C3F1 mice than in F344 rats. *Toxicol Sci.* 51:289-99.
- Marciniak, S.J., and D.A. Lomas. 2009. What can naturally occurring mutations tell us about the pathogenesis of COPD? *Thorax.* 64:359-64.
- Marinissen, M.J., and J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-76.

- Martin, L.D., T.M. Krunkosky, J.A. Dye, B.M. Fischer, N.F. Jiang, L.G. Rochelle, N.J. Akley, K.L. Dreher, and K.B. Adler. 1997. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 5:1301-7.
- Martin, R.L., S.D. Shapiro, S.E. Tong, and H.E. Van Wart. 2001. Macrophage Metalloelastase Inhibitors. *Prog Respir Res.* 31:177-180.
- Martin, T.R., G. Rubenfeld, K.P. Steinberg, L.D. Hudson, G. Raghu, A.M. Moriarty, D.J. Leturcq, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch. 1994. Endotoxin, endotoxin-binding protein, and soluble CD14 are present in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 105:55S-56S.
- Martorana, P.A., R. Beume, M. Lucattelli, L. Wollin, and G. Lungarella. 2005. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:848-53.
- Marwick, J.A., K. Ito, I.M. Adcock, and P.A. Kirkham. 2007. Oxidative stress and steroid resistance in asthma and COPD: pharmacological manipulation of HDAC-2 as a therapeutic strategy. *Expert Opin Ther Targets.* 11:745-55.
- Masubuchi, T., S. Koyama, E. Sato, A. Takamizawa, K. Kubo, M. Sekiguchi, S. Nagai, and T. Izumi. 1998. Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Pathol.* 153:1903-12.
- Mata, M., B. Sarria, A. Buenestado, J. Cortijo, M. Cerda, and E.J. Morcillo. 2005. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax.* 60:144-52.
- Matera, M.G., L. Calzetta, and M. Cazzola. 2009. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther.* 23:121-8.
- Mathers, C.D., and D. Loncar. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3:e442.
- Matsumoto, S., T. Kobayashi, M. Katoh, S. Saito, Y. Ikeda, M. Kobori, Y. Masuho, and T. Watanabe. 1998. Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am J Pathol.* 153:109-19.
- Matsunaga, K., T.W. Klein, H. Friedman, and Y. Yamamoto. 2001. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol.* 167:6518-24.
- Matthews, J.S., and L.A. O'Neill. 1999. Distinct roles for p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases in the induction of IL-2 by IL-1. *Cytokine.* 11:643-55.
- Mauders, H., S. Patwardhan, J. Phillips, A. Clack, and A. Richter. 2007. Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292:L1248-56.
- McColl, S.R., and I. Clark-Lewis. 1999. Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists. *J Immunol.* 163:2829-35.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1:135-45.
- Mercer, B.A., N. Kolesnikova, J. Sonett, and J. D'Armiento. 2004. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem.* 279:17690-6.
- Mercer, P.F., J.K. Shute, A. Bhowmik, G.C. Donaldson, J.A. Wedzicha, and J.A. Warner. 2005. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res.* 6:151.
- Milam, J.E., V.G. Keshamouni, S.H. Phan, B. Hu, S.R. Gangireddy, C.M. Hogaboam, T.J. Standiford, V.J. Thannickal, and R.C. Reddy. 2008. PPAR-gamma agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294:L891-901.

- Milara, J., M. Armengot, P. Banuls, H. Tenor, R. Beume, E. Artigues, and J. Cortijo. 2012. Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol*. 166:2243-62.
- Mio, T., D.J. Romberger, A.B. Thompson, R.A. Robbins, A. Heires, and S.I. Rennard. 1997. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 155:1770-6.
- Miyajima, K., S. Nakajima, M. Taguchi, A. Hayashi, N. Kajiwar, O. Uchida, T. Kono, M. Takahashi, K. Kawanishi, M. Tanaka, H. Takizawa, and H. Kato. 2005. Cytokine responsiveness in cultured human small airway epithelial cells in relation to lung transplantation. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 11:374-81.
- Moodie, F.M., J.A. Marwick, C.S. Anderson, P. Szulakowski, S.K. Biswas, M.R. Bouter, I. Kilty, and I. Rahman. 2004. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J*. 18:1897-9.
- Moretto, N., S. Bertolini, C. Iadicicco, G. Marchini, M. Kaur, G. Volpi, R. Patacchini, D. Singh, and F. Facchinetti. 2012. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 303:L929-38.
- Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima. 1998a. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 9:9-23.
- Mukaida, N., T. Matsumoto, K. Yokoi, A. Harada, and K. Matsushima. 1998b. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflamm Res*. 47 Suppl 3:S151-7.
- Mulligan, R.M., C. Atkinson, A.A. Vertegel, V. Reukov, and R.J. Schlosser. 2009. Cigarette smoke extract stimulates interleukin-8 production in human airway epithelium and is attenuated by superoxide dismutase in vitro. *Am J Rhinol Allergy*. 23:e1-4.
- Nakamura, H., K. Yoshimura, N.G. McElvaney, and R.G. Crystal. 1992. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest*. 89:1478-84.
- Nakhaei, P., P. Genin, A. Civas, and J. Hiscott. 2009. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol*. 21:215-22.
- Nenan, S., V. Lagente, J.M. Planquois, S. Hitier, P. Berna, C.P. Bertrand, and E. Boichot. 2007. Metalloelastase (MMP-12) induced inflammatory response in mice airways: effects of dexamethasone, rolapram and marimastat. *Eur J Pharmacol*. 559:75-81.
- New, D.C., and Y.H. Wong. 2007. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*. 2:2.
- Noguera, A., E. Sala, A.R. Pons, J. Iglesias, W. MacNee, and A.G. Agusti. 2004. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *Chest*. 125:1837-42.
- O'Brien, A.D., T.J. Standiford, P.J. Christensen, S.E. Wilcoxon, and R. Paine, 3rd. 1998. Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *J Lab Clin Med*. 131:417-24.
- O'Donnell, D.E., P. Hernandez, S. Aaron, J. Bourbeau, D. Marciniuk, R. Hodder, M. Balter, G. Ford, A. Gervais, R. Goldstein, F. Maltais, J. Road, V. McKay, and J. Schenkel. 2003. [Canadian Thoracic Society COPD guidelines: summary of highlights for family doctors]. *Can Respir J*. 10:463-6.
- O'Shaughnessy, T.C., T.W. Ansari, N.C. Barnes, and P.K. Jeffery. 1997. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. 155:852-7.
- Ohbayashi, H. 2002. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. *Expert Opin Investig Drugs*. 11:965-80.

- Ohnishi, K., M. Takagi, Y. Kurokawa, S. Satomi, and Y.T. Konttinen. 1998. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest.* 78:1077-87.
- Olivera, D.S., S.E. Boggs, C. Beenhouwer, J. Aden, and C. Knall. 2007. Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro. *Inhal Toxicol.* 19:13-22.
- Ovrevik, J., M. Lag, P. Schwarze, and M. Refsnes. 2004. p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells. *Toxicol Sci.* 81:480-90.
- Owen, C.A. 2008. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 3:253-68.
- Pace, E., M. Ferraro, L. Siena, M. Melis, A.M. Montalbano, M. Johnson, M.R. Bonsignore, G. Bonsignore, and M. Gjomarkaj. 2008. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology.* 124:401-11.
- Papi, A., C.M. Bellettato, F. Braccioni, M. Romagnoli, P. Casolari, G. Caramori, L.M. Fabbri, and S.L. Johnston. 2006a. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:1114-21.
- Papi, A., F. Luppi, F. Franco, and L.M. Fabbri. 2006b. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 3:245-51.
- Park, J.A., F. He, L.D. Martin, Y. Li, B.N. Chorley, and K.B. Adler. 2005. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C $\{\delta\}$ -mediated mechanism. *Am J Pathol.* 167:651-61.
- Park, S.M., H.S. Kim, J. Choe, and T.H. Lee. 1999. Differential induction of cytokine genes and activation of mitogen-activated protein kinase family by soluble CD40 ligand and TNF in a human follicular dendritic cell line. *J Immunol.* 163:631-8.
- Parsons, S.J., and J.T. Parsons. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 23:7906-9.
- Patel, I.S., T.A. Seemungal, M. Wilks, S.J. Lloyd-Owen, G.C. Donaldson, and J.A. Wedzicha. 2002. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax.* 57:759-64.
- Pattle, R.E. 1955. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature.* 175:1125-6.
- Pauly, J.L., L.A. Smith, M.H. Rickert, A. Hutson, and G.M. Paszkiewicz. 2010. Review: Is lung inflammation associated with microbes and microbial toxins in cigarette tobacco smoke? *Immunol Res.* 46:127-36.
- Persson, C., D. Subramaniam, T. Stevens, and S. Janciauskiene. 2006. Do native and polymeric alpha1-antitrypsin activate human neutrophils in vitro? *Chest.* 129:1683-92.
- Petrache, I., I. Fijalkowska, L. Zhen, T.R. Medler, E. Brown, P. Cruz, K.H. Choe, L. Taraseviciene-Stewart, R. Scerbavicius, L. Shapiro, B. Zhang, S. Song, D. Hicklin, N.F. Voelkel, T. Flotte, and R.M. Tudor. 2006. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:1222-8.
- Pham, C.T. 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 6:541-50.
- Phillips, J., B. Kluss, A. Richter, and E. Massey. 2005. Exposure of bronchial epithelial cells to whole cigarette smoke: assessment of cellular responses. *Altern Lab Anim.* 33:239-48.
- Probst, G.D., S. Bowers, J.M. Sealy, A.P. Truong, R.K. Hom, R.A. Galembo, Jr., A.W. Konradi, H.L. Sham, D.A. Quincy, H. Pan, N. Yao, M. Lin, G. Toth, D.R. Artis, W. Zmolek, K. Wong, A. Qin, C. Lorentzen, D.F. Nakamura, K.P. Quinn, J.M. Sauer, K. Powell, L. Ruslim, S. Wright, D. Chereau, Z. Ren, J.P. Anderson, F. Bard, T.A. Yednock, and I. Griswold-Prenner. 2011. Highly selective c-Jun N-terminal kinase (JNK) 2 and 3 inhibitors with in vitro CNS-like pharmacokinetic properties prevent neurodegeneration. *Bioorg Med Chem Lett.* 21:315-9.

- Pryor, W.A., and K. Stone. 1993. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 686:12-27; discussion 27-8.
- Rahman, I. 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol.* 36:95-109.
- Rahman, I., P.S. Gilmour, L.A. Jimenez, and W. MacNee. 2002. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem.* 234-235:239-48.
- Rahman, I., and W. MacNee. 1996. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med.* 21:669-81.
- Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, J. Siple, H. Nagase, D.L. French, and J.P. Quigley. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 274:13066-76.
- Rao, N.V., N.G. Wehner, B.C. Marshall, W.R. Gray, B.H. Gray, and J.R. Hoidal. 1991. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J Biol Chem.* 266:9540-8.
- Reid, P.T., M.E. Marsden, G.A. Cunningham, C. Haslett, and J.M. Sallenave. 1999. Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 457:33-7.
- Renesto, P., M. Si-Tahar, M. Moniatte, V. Balloy, A. Van Dorsselaer, D. Pidard, and M. Chignard. 1997. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood.* 89:1944-53.
- Repine, J.E., A. Bast, and I. Lankhorst. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:341-57.
- Retamales, I., W.M. Elliott, B. Meshi, H.O. Coxson, P.D. Pare, F.C. Sciurba, R.M. Rogers, S. Hayashi, and J.C. Hogg. 2001. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:469-73.
- Reynolds, F.H., Jr., G.J. Todaro, C. Fryling, and J.R. Stephenson. 1981. Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature.* 292:259-62.
- Richter, A., R.A. O'Donnell, R.M. Powell, M.W. Sanders, S.T. Holgate, R. Djukanovic, and D.E. Davies. 2002. Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:85-90.
- Rodgman, A., C.J. Smith, and T.A. Perfetti. 2000. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol.* 19:573-95.
- Roghani, A., E.M. Drost, W. MacNee, S.E. Howie, and J.M. Sallenave. 2006. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med.* 174:1189-98.
- Rolfe, M.W., S.L. Kunkel, T.J. Standiford, M.B. Orringer, S.H. Phan, H.L. Evanoff, M.D. Burdick, and R.M. Strieter. 1992. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Am J Physiol.* 263:L536-45.
- Rossol, M., H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M.J. Sweet, and S. Hauschildt. 2011. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 31:379-446.
- Russell, R.E., S.V. Culpitt, C. DeMatos, L. Donnelly, M. Smith, J. Wiggins, and P.J. Barnes. 2002. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26:602-9.
- Rusznak, C., P.R. Mills, J.L. Devalia, R.J. Sapsford, R.J. Davies, and S. Lozewicz. 2000. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial

- epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23:530-6.
- Rycroft, C.E., A. Heyes, L. Lanza, and K. Becker. 2012. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: a literature review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 7:457-94.
- Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S.Y. Nam, A. Bauer, M. Karin, and E.F. Wagner. 2004. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell*. 15:713-25.
- Sabatini, F., L. Petecchia, S. Boero, M. Silvestri, J. Klar, H. Tenor, R. Beume, A. Hatzelmann, and G.A. Rossi. 2010. A phosphodiesterase 4 inhibitor, roflumilast N-oxide, inhibits human lung fibroblast functions in vitro. *Pulm Pharmacol Ther*. 23:283-91.
- Saetta, M., S. Baraldo, L. Corbino, G. Turato, F. Braccioni, F. Rea, G. Cavallero, G. Tropeano, C.E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, and L.M. Fabbri. 1999. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:711-7.
- Saetta, M., A. Di Stefano, P. Maestrelli, G. Turato, C.E. Mapp, M. Pieno, G. Zanguochi, G. Del Prete, and L.M. Fabbri. 1996. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy*. 26:766-74.
- Saha, S., and C.E. Brightling. 2006. Eosinophilic airway inflammation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 1:39-47.
- Salcedo, R., M.L. Ponce, H.A. Young, K. Wasserman, J.M. Ward, H.K. Kleinman, J.J. Oppenheim, and W.J. Murphy. 2000. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 96:34-40.
- Sallenave, J.M. 2000. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir Res*. 1:87-92.
- Sallenave, J.M. 2002. Antimicrobial activity of antiproteases. *Biochem Soc Trans*. 30:111-5.
- Sallenave, J.M., J. Shulmann, J. Crossley, M. Jordana, and J. Gauldie. 1994. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 11:733-41.
- Sallenave, J.M., M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, and J. Gauldie. 1997. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 61:695-702.
- Sallenave, J.M., A. Silva, M.E. Marsden, and A.P. Ryle. 1993. Secretion of mucus proteinase inhibitor and elafin by Clara cell and type II pneumocyte cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 8:126-33.
- Sambrano, G.R., W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik, and S.R. Coughlin. 2000. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem*. 275:6819-23.
- Santegoets, S.J., A.J. van den Eertwegh, A.A. van de Loosdrecht, R.J. Scheper, and T.D. de Gruijl. 2008. Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies. *J Leukoc Biol*. 84:1364-73.
- Sapey, E., A. Ahmad, D. Bayley, P. Newbold, N. Snell, P. Rugman, and R.A. Stockley. 2009. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD. *J Clin Immunol*. 29:508-16.
- Sapkota, A.R., S. Berger, and T.M. Vogel. 2010. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect*. 118:351-6.
- Sarir, H., E. Mortaz, K. Karimi, A.D. Kraneveld, I. Rahman, E. Caldenhoven, F.P. Nijkamp, and G. Folkerts. 2009. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. *J Inflamm (Lond)*. 6:12.
- Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R.G. Jones, A.J. Oliveira-dos-Santos, W.L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T.W. Mak, P.S. Ohashi, A. Suzuki, and J.M. Penninger. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 287:1040-6.

- Scaltriti, M., and J. Baselga. 2006. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 12:5268-72.
- Schaberg, T., H. Haller, M. Rau, D. Kaiser, M. Fassbender, and H. Lode. 1992. Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *Eur Respir J.* 5:387-93.
- Schwarz, M.K., and T.N. Wells. 2002. New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat Rev Drug Discov.* 1:347-58.
- Scuderi, P., P.A. Nez, M.L. Duerr, B.J. Wong, and C.M. Valdez. 1991. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol.* 135:299-313.
- Seemungal, T.A., G.C. Donaldson, E.A. Paul, J.C. Bestall, D.J. Jeffries, and J.A. Wedzicha. 1998. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1418-22.
- Segura-Valdez, L., A. Pardo, M. Gaxiola, B.D. Uhal, C. Becerril, and M. Selman. 2000. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest.* 117:684-94.
- Selman, M., V. Ruiz, S. Cabrera, L. Segura, R. Ramirez, R. Barrios, and A. Pardo. 2000. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L562-74.
- Senior, R.M., H. Tegner, C. Kuhn, K. Ohlsson, B.C. Starcher, and J.A. Pierce. 1977. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis.* 116:469-75.
- Sethi, S., J. Maloney, L. Grove, C. Wrona, and C.S. Berenson. 2006. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:991-8.
- Sethi, S., and T.F. Murphy. 2008. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 359:2355-65.
- Severgnini, M., S. Takahashi, L.M. Rozo, R.J. Homer, C. Kuhn, J.W. Jhung, G. Perides, M. Steer, P.M. Hassoun, B.L. Fanburg, B.H. Cochran, and A.R. Simon. 2004. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286:L1282-92.
- Shao, M.X., and J.A. Nadel. 2005. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol.* 175:4009-16.
- Shuh, M., B.A. Morse, G. Heidecker, and D. Derse. 2011. Association of SRC-related kinase Lyn with the interleukin-2 receptor and its role in maintaining constitutive phosphorylation of JAK/STAT in human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *J Virol.* 85:4623-7.
- Silvestre, J.S., and B.I. Levy. 2002. [Role of matrix proteolysis in angiogenesis]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu:*23-32.
- Simpson, A.J., A.I. Maxwell, J.R. Govan, C. Haslett, and J.M. Sallenave. 1999. Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* 452:309-13.
- Skeldon, A., and M. Saleh. 2011. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. *Front Microbiol.* 2:15.
- Skiles, J.W., N.C. Gonnella, and A.Y. Jeng. 2001. The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem.* 8:425-74.
- Smith, S.J., P.S. Fenwick, A.G. Nicholson, F. Kirschenbaum, T.K. Finney-Hayward, L.S. Higgins, M.A. Giembycz, P.J. Barnes, and L.E. Donnelly. 2006. Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol.* 149:393-404.
- Snider, G.L., E.C. Lucey, and P.J. Stone. 1986. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 133:149-69.

- Sohn, M.H., K.E. Lee, K.W. Kim, E.S. Kim, J.Y. Park, and K.E. Kim. 2007. Calcium-Calmodulin Mediates House Dust Mite-Induced ERK Activation and IL-8 Production in Human Respiratory Epithelial Cells. *Respiration*.
- Sparkman, L., and V. Boggaram. 2004. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 287:L764-73.
- Sparrow, D., R.J. Glynn, M. Cohen, and S.T. Weiss. 1984. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest*. 86:383-6.
- Spond, J., R. Chapman, J. Fine, H. Jones, W. Kreutner, T.T. Kung, and M. Minnicozzi. 2001. Comparison of PDE 4 inhibitors, rolipram and SB 207499 (ariflo), in a rat model of pulmonary neutrophilia. *Pulm Pharmacol Ther*. 14:157-64.
- Srivastava, P.K., S.G. Dastidar, and A. Ray. 2007. Chronic obstructive pulmonary disease: role of matrix metalloproteases and future challenges of drug therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 16:1069-78.
- St-Laurent, J., L.I. Proulx, L.P. Boulet, and E. Bissonnette. 2009. Comparison of two in vitro models of cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol*. 21:1148-53.
- Standiford, T.J., S.L. Kunkel, S.H. Phan, B.J. Rollins, and R.M. Strieter. 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem*. 266:9912-8.
- Stanescu, D., A. Sanna, C. Veriter, S. Kostianev, P.G. Calcagni, L.M. Fabbri, and P. Maestrelli. 1996. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 51:267-71.
- Stevens, T., K. Ekholm, M. Granse, M. Lindahl, V. Kozma, C. Jungar, T. Ottosson, H. Falk-Hakansson, A. Churg, J.L. Wright, H. Lal, and A. Sanfridson. 2011. AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase. *J Pharmacol Exp Ther*. 339:313-20.
- Stockley, R., A. De Soyza, K. Gunawardena, J. Perrett, K. Forsman-Semb, N. Entwistle, and N. Snell. 2013. Phase II study of a neutrophil elastase inhibitor (AZD9668) in patients with bronchiectasis. *Respir Med*. 107:524-33.
- Stockley, R.A., C. O'Brien, A. Pye, and S.L. Hill. 2000. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. 117:1638-45.
- Stone, K.C., R.R. Mercer, P. Gehr, B. Stockstill, and J.D. Crapo. 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 6:235-43.
- Sturton, R.G., A. Trifilieff, A.G. Nicholson, and P.J. Barnes. 2008. Pharmacological characterization of indacaterol, a novel once daily inhaled 2 adrenoceptor agonist, on small airways in human and rat precision-cut lung slices. *J Pharmacol Exp Ther*. 324:270-5.
- Su, J.C., K.L. Lin, C.M. Chien, P.W. Chuang, L.S. Chang, and S.R. Lin. 2010. Concomitant inactivation of the epidermal growth factor receptor, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Janus tyrosine kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signalling pathways in cardiotoxin III-treated A549 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 37:833-40.
- Suissa, S., P. Ernst, and M. Hudson. 2008. TNF-alpha antagonists and the prevention of hospitalisation for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 21:234-8.
- Sun, H., W.C. Chung, S.H. Ryu, Z. Ju, H.T. Tran, E. Kim, J.M. Kurie, and J.S. Koo. 2008. Cyclic AMP-responsive element binding protein- and nuclear factor-kappaB-regulated CXC chemokine gene expression in lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 1:316-28.
- Suzuki, T., C. Yamashita, R.L. Zemans, N. Briones, A. Van Linden, and G.P. Downey. 2009. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via a PAR-1-, NF-kappaB-, and p53-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 41:742-55.
- Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 16:3-9.

- Tanino, M., T. Betsuyaku, K. Takeyabu, Y. Tanino, E. Yamaguchi, K. Miyamoto, and M. Nishimura. 2002. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax*. 57:405-11.
- Tashkin, D., R. Kanner, W. Bailey, S. Buist, P. Anderson, M. Nides, D. Gonzales, G. Dozier, M.K. Patel, and B. Jamerson. 2001. Smoking cessation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 357:1571-5.
- Tashkin, D.P., A.H. Coulson, V.A. Clark, M. Simmons, L.B. Bourque, S. Duann, G.H. Spivey, and H. Gong. 1987. Respiratory symptoms and lung function in habitual heavy smokers of marijuana alone, smokers of marijuana and tobacco, smokers of tobacco alone, and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*. 135:209-16.
- Tetley, T.D. 2002. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 121:156S-159S.
- Thomas, S.M., and J.S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:513-609.
- Thorley, A.J., P.A. Ford, M.A. Gienbycz, P. Goldstraw, A. Young, and T.D. Tetley. 2007. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 178:463-73.
- Tomita, K., P.J. Barnes, and I.M. Adcock. 2003. The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. *Biochem Biophys Res Commun*. 301:572-7.
- Tomita, K., G. Caramori, S. Lim, K. Ito, T. Hanazawa, T. Oates, I. Chiselita, E. Jazrawi, K.F. Chung, P.J. Barnes, and I.M. Adcock. 2002. Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 166:724-31.
- Traves, S.L., S.V. Culpitt, R.E. Russell, P.J. Barnes, and L.E. Donnelly. 2002. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*. 57:590-5.
- Traves, S.L., S.J. Smith, P.J. Barnes, and L.E. Donnelly. 2004. Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol*. 76:441-50.
- Tremblay, G.M., M.F. Janelle, and Y. Bourbonnais. 2003. Anti-inflammatory activity of neutrophil elastase inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs*. 4:556-65.
- Tsai, J.R., I.W. Chong, C.C. Chen, S.R. Lin, C.C. Sheu, and J.J. Hwang. 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway was significantly activated in human bronchial epithelial cells by nicotine. *DNA Cell Biol*. 25:312-22.
- Tseng, H.Y., Z.M. Liu, and H.S. Huang. 2012. NADPH oxidase-produced superoxide mediates EGFR transactivation by c-Src in arsenic trioxide-stimulated human keratinocytes. *Arch Toxicol*. 86:935-45.
- Tuder, R.M., L. Zhen, C.Y. Cho, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, D. Salvemini, N.F. Voelkel, and S.C. Flores. 2003. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29:88-97.
- Valentine, R., R.B. Rucker, C.E. Chrisp, and G.L. Fisher. 1983. Morphological and biochemical features of elastase-induced emphysema in strain A/J mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 68:451-61.
- van 't Wout, E.F., A. van Schadewijk, N.D. Savage, J. Stolk, and P.S. Hiemstra. alpha1-antitrypsin production by proinflammatory and antiinflammatory macrophages and dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 46:607-13.
- van Noord, J.A., J.L. Aumann, E. Janssens, J. Verhaert, J.J. Smeets, A. Mueller, and P.J. Cornelissen. 2006. Effects of tiotropium with and without formoterol on airflow obstruction and resting hyperinflation in patients with COPD. *Chest*. 129:509-17.
- Van Wetering, S., S.P. Mannesse-Lazeroms, J.H. Dijkman, and P.S. Hiemstra. 1997. Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J Leukoc Biol*. 62:217-26.
- Venembre, P., A. Boutten, N. Seta, M.S. Dehoux, B. Crestani, M. Aubier, and G. Durand. 1994. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Lett*. 346:171-4.

- Vernooy, J.H., M.A. Dentener, R.J. van Suylen, W.A. Buurman, and E.F. Wouters. 2002. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26:152-9.
- Wallace, W.A., M. Gillooly, and D. Lamb. 1992. Intra-alveolar macrophage numbers in current smokers and non-smokers: a morphometric study of tissue sections. *Thorax.* 47:437-40.
- Walsh, D.E., C.M. Greene, T.P. Carroll, C.C. Taggart, P.M. Gallagher, S.J. O'Neill, and N.G. McElvaney. 2001. Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *J Biol Chem.* 276:35494-9.
- Wang, I.M., C. Contursi, A. Masumi, X. Ma, G. Trinchieri, and K. Ozato. 2000. An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J Immunol.* 165:271-9.
- Wartha, F., K. Beiter, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 10:52-6.
- Weber, K.S., P.J. Nelson, H.J. Grone, and C. Weber. 1999. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2085-93.
- Werb, Z., and S. Gordon. 1975. Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J Exp Med.* 142:361-77.
- Williams, S.E., T.I. Brown, A. Roghanian, and J.M. Sallenave. 2006. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 110:21-35.
- Wingens, M., B.H. van Bergen, P.S. Hiemstra, J.F. Meis, I.M. van Vlijmen-Willems, P.L. Zeeuwen, J. Mulder, H.A. Kramps, F. van Ruissen, and J. Schalkwijk. 1998. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 111:996-1002.
- Witherden, I.R., E.J. Vanden Bon, P. Goldstraw, C. Ratcliffe, U. Pastorino, and T.D. Tetley. 2004. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30:500-9.
- Wood, A.M., and R.A. Stockley. 2007. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. *Respiration.* 74:481-92.
- Wright, J.L., S.G. Farmer, and A. Churg. 2002. Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:954-60.
- Xie, S., R. Issa, M.B. Sukkar, U. Oltmanns, P.K. Bhavsar, A. Papi, G. Caramori, I. Adcock, and K.F. Chung. 2005. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res.* 6:148.
- Yamaya, A., and K. Osanai. 2011. [Cytokines and proteases involved in pathogenesis of COPD]. *Nihon Rinsho.* 69:1748-53.
- Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* 513:1-13.
- Yu, Y., H. Zeng, S. Lyons, A. Carlson, D. Merlin, A.S. Neish, and A.T. Gewirtz. 2003. TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285:G282-90.
- Zalacain, R., V. Sobradillo, J. Amilibia, J. Barron, V. Achotegui, J.I. Pijoan, and J.L. Llorente. 1999. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 13:343-8.
- Zassadowski, F., C. Rochette-Egly, C. Chomienne, and B. Cassinat. 2012. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal.* 24:2369-77.
- Zelensky, A.N., and J.E. Gready. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272:6179-217.
- Zhang, H., Z.W. Wang, H.B. Wu, Z. Li, L.C. Li, X.P. Hu, Z.L. Ren, B.J. Li, and Z.P. Hu. 2013. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF-kappaB pathways. *Mol Cell Biochem.* 375:11-21.

- Zhang, Q., L. Cheng, R. Xing, L. Ma, C. Li, Y. Xu, and W. Wu. 2011. [Effects of NF-kappaB on the expression of IL-8 in human bronchial epithelial cells induced by cigarette smoke condensates]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 40:573-5.
- Zhang, Y., D.L. DeWitt, T.B. McNeely, S.M. Wahl, and L.M. Wahl. 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest*. 99:894-900.
- ZuWallack, R.L., D.A. Mahler, D. Reilly, N. Church, A. Emmett, K. Rickard, and K. Knobil. 2001. Salmeterol plus theophylline combination therapy in the treatment of COPD. *Chest*. 119:1661-70.

ANNEXES

Ces travaux ont été présentés dans les congrès suivant :

XV Meeting Brazilian Society for Cell Biology (2010). São Paulo, Brazil. Poster: “Effect of the combination of cigarette smoke extract (cse) or neutrophil elastase (ne) and lipopolysaccharide (lps) on epithelial cells”. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

Journées de recherche respiratoire (2010). Nantes, France. Poster: “Effect of cigarette smoke extract (CSE) and neutrophil elastase (NE) with lipopolysaccharide (LPS) on epithelial cells”. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

10th World Congress on Inflammation (2011). Paris, France. Poster: “Roflumilast n-oxide reduces release of IL-8 and VEGF from airway epithelial A549 cells exposed to cigarette smoke extract (CSE) and lipopolysaccharide (LPS). Victoni T¹, Lanzetti M², Aubert J¹, Lebouc M¹, Guenon I¹, Porto LC², Boichot E¹, Tenor H³. Lagente V¹. 1: UMR INSERM 991, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. France. 2: Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3: Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

Journée des doctorants de la faculté de Pharmacie (2011). Rennes, France. Poster: “Effet de l'extrait de fumée de cigarette et de l'élastase du neutrophile associées au lipopolysaccharide sur les cellules épithéliales humaines”. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

VII Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique (2012). Dijon, France.

Communication orale: “Combination cigarette smoke extract (cse) and lipolysaccharide (lps) induced cytokines release in epithelial cells by JNK and JAK/STAT JNK signaling pathway”.et poster: Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

XVI Meeting Brazilian Society for Cell Biology (2012). Rio de Janeiro, Brazil. Poster:

“Additive effect of cigarette smoke extract (CSE) and lipolysaccharide (LPS) on proinflammatory cytokine release through activation of JAK/STAT pathways in human airway epithelial cells”. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

Journées de recherche respiratoire (2012). Lille, France.

“Cigarette smoke extract (cse) and lipolysaccharide (lps) induce chimiokine release from epithelial cells by JAK/STAT signaling pathway” et “Activation of macrophages by uric acid crystals engages NLRP3-inflammasome pathway and purinergic receptors.” ”. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

The underestimated role of epithelium in inflammation (12/04/2013). Pasteur institute, Paris, France.

Neutrophil elastase (ne) and cigarette smoke extract (cse) combined with a low concentration of lipolysaccharide (lps) induced cytokine release from epithelial cells through jak/stat and erk1/2 signaling pathways. Tatiana VICTONI¹, Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Manuella LANZETTI², Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO²,

Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

American Thoracic Society International Conference (2013) Philadelphia.USA.

Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells. Tatiana VICTONI¹, Manuella LANZETTI², Florence GLEONNEC¹, Lucie BEAUTRAIS¹, Hermann Tenor³, Samuel S. VALENÇA², Luis Cristovão PORTO², Elisabeth BOICHOT¹, Vincent LAGENTE¹. 1 : UMR991 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1. Rennes, France. 2 : Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 : Nycomed GmbH, Konstanz, Germany

Résumé

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie caractérisée par une réaction inflammatoire intense avec une destruction du parenchyme pulmonaire et une perte d'élasticité du poumon conduisant à une obstruction quasi-irréversible des voies aériennes. L'utilisation du tabac est le principal facteur de risque de cette maladie. La fumée de cigarette active les cellules épithéliales et les macrophages résidents en libérant des protéases et des chimiokines. Ces phénomènes sont responsables de l'infiltration de cellules inflammatoires dans le poumon, telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Ces cellules libèrent des enzymes protéolytiques capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Parmi ces protéases, l'élastase du neutrophile (NE) semble stimuler la sécrétion de cytokines, participant ainsi à une inflammation chronique. De fortes évidences montrent que des infections bactériennes récurrentes contribuent à ce processus inflammatoire et par conséquent à l'aggravation de la BPCO. A partir de ces observations, nous nous sommes intéressés aux événements précoces du développement de la BPCO associés à une infection bactérienne récurrente.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'association d'un extrait de fumée de cigarette à de faibles doses de LPS est capable d'augmenter de façon synergique la libération des chimiokines par les cellules épithéliales alvéolaires. Ce phénomène implique l'activation des voies de signalisation MAP kinase ERK1/2 et JAK/STAT. Nous avons mis en évidence que l'inhibiteur de la phosphodiesterase 4, le roflumilast N-oxide, empêche la sécrétion de ces cytokines inactivant ainsi les voies JAK/STAT et ERK1/2.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que la NE peut conduire à la libération de chimiokines par des cellules épithéliales alvéolaires en activant la voie de signalisation p38 et que le roflumilast N-oxide diminue le taux de ces chimiokines.

Une approche *in vitro* sur un modèle de cellules épithéliales alvéolaires a permis de démontrer l'effet synergique du CSE associé au LPS sur la libération de cytokines et sur l'activation des voies de signalisation. Cet effet pourrait être responsable de la progression et de l'exacerbation de la BPCO. Notre étude montre aussi les effets du roflumilast sur la libération de cytokines induites par la NE ou par le CSE/LPS. Ces résultats mettent en lumière d'autres mécanismes par lesquels le roflumilast N-oxide exerce son effet anti-inflammatoire dans la BPCO.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a pathology characterized by an abnormal inflammatory response and associated with a destruction of lung parenchyma and loss of lung elasticity, leading to an airway limitation not fully reversible. Tobacco smoking continues to be a major cause of COPD. Cigarette smoke activates epithelial cells and resident macrophages by releasing proteases and chemokines. This phenomenon is responsible of the migration of inflammatory cells in the lung tissue such as neutrophils, macrophages and lymphocytes. These cells are able to release proteolytic enzymes leading to the degradation of components of the extracellular matrix. Among these proteases, neutrophil elastase (NE) seems to stimulate the secretion of cytokines involved in chronic inflammation. Strong evidence shows that recurrent bacterial infections contribute to the inflammatory process and consequently to the worsening of COPD. Based on these observations, we studied the early events in the development of COPD associated with recurrent bacterial infection. Initially we showed that the combination of a cigarette smoke extract associated with low doses of LPS is able to synergistically increase the release of chemokines, by alveolar epithelial cells through the activation of MAP kinase signaling pathways ERK1/2 and JAK/STAT. We also demonstrated that the phosphodiesterase 4 inhibitor, roflumilast N-oxide (RNO) inhibits the secretion of these cytokines, thereby inactivating pathways JAK/STAT and ERK1/2. Moreover, we have demonstrated that neutrophil elastase (NE) can lead to the release of chemokines by alveolar epithelial cells by activating the p38 signaling pathway. Moreover the treatment of the cells with roflumilast N-oxide significantly reduces the production of these chemokines. This *in vitro* model demonstrates the synergistic effect of CSE associated with LPS on the release of cytokines and activation of signaling pathways. This effect could be responsible for the progression and exacerbation of COPD. Our study also shows the effect of RNO on the release of cytokines induced by NE or by the combination CSE/LPS. These results highlight other mechanisms by which Roflumilast N-oxide exerts its anti-inflammatory effect in COPD